

Aus der Klinik und Poliklinik
für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg

**ZELLBASIERTE TESTUNG VON HEPATOTOXIZITÄT MIT DER PERMANENTEN
ZELLINIE HEPG2/C3A:
STANDARDISIERUNG, VALIDIERUNG, PARAMETERERWEITERUNG UND TESTUNG
VON INTENSIVMEDIZINISCH RELEVANTEN MEDIKAMENTEN AM BEISPIEL DER
ANTIMYKOTIKA UND PARACETAMOL**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften (doctor rerum humanarum)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Sandra Doß

Gutachter:

1. Gutachter:

PD Dr. med. Martin Sauer

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Steffen Mitzner

Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Nephrologie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Werner Siegmund

Universität Greifswald – Institut für Pharmakologie

Datum der Einreichung: 20.03.2015

Datum der Verteidigung: 04.05.2016

Für meine Familie.

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

Albert Einstein (1879 -1955)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	V
III.	Abbildungsverzeichnis	VIII
IV.	Tabellenverzeichnis	XI
1	EINLEITUNG	1
1.1	Leberversagen	1
1.2	Hepatotoxizität durch Arzneimittel	2
1.2.1	Klassifikation	3
1.2.2	Mechanismen der Hepatotoxizität / Biotransformation	4
1.3	Toxikologische Testungen von Medikamenten	7
1.3.1	Allgemeine toxikologische Testung	7
1.3.2	Testung auf Hepatotoxizität	10
1.4	Antimykotika	13
1.4.1	Polyene	15
1.4.1.1	Liposomales Amphotericin B	15
1.4.2	Echinocandine	16
1.4.2.1	Caspofungin	16
1.4.2.2	Anidulafungin	17
1.4.3	Azole	17
1.4.3.1	Fluconazol	18
1.4.3.2	Voriconazol	18
2	ZIELSTELLUNG	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Testsubstanzen	21
3.1.1	Antimykotika	21

I

3.1.2	Paracetamol	22
3.2	Allgemeine Zellkultur	22
3.2.1	Morphologie	22
3.2.2	Kultivierung	22
3.2.3	Master- und Workingzellbank	23
3.3	Hepatotoxizität	24
3.3.1	Herstellung eines Plasmapools	24
3.3.2	Testvorbereitung	25
3.3.3	Testdurchführung	25
3.4	Parameter des Hepatotoxizitätstest	27
3.4.1	Bestimmung von Vitalität und Proliferation	27
3.4.1.1	Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellvitalität	27
3.4.1.2	Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase	27
3.4.1.3	Live/Dead Färbung	28
3.4.1.4	Elektronenmikroskopie	29
3.4.1.5	Live Cell Imager	30
3.4.2	Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin	30
3.4.3	Aktivität von Enzymsystemen	31
3.4.3.1	Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP1A2	31
3.4.3.2	Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP3A4	32
3.4.4	Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test)	32
3.4.5	Zelluntergang – Apoptose / Nekrose	34
3.4.5.1	Durchflusszytometrie	34
3.4.5.2	Nachweis DNA-Fragmentierung mit der TUNEL-Methode	35
3.4.5.3	Charakterisierung des CD95-Rezeptors	36
3.5	Test-Validierung mit primären isolierten Hepatozyten	37
3.5.1	Versuchsübersicht	37
3.5.2	Testparameter	38

3.5.2.1	Zellvitalität - MTT Assay	38
3.5.2.2	EROD-Assay und Proteinbestimmung	39
3.5.2.3	Bestimmung der Harnstoff- und Albuminkonzentration	39
3.5.2.4	Bestimmung der Albuminkonzentration	39
3.6	Statistik	40
4	ERGEBNISSE	41
4.1	Master- und Workingzellbank	41
4.2	Parameter des Hepatotoxizitätstest	42
4.2.1	Bestimmung von Vitalität und Proliferation	42
4.2.1.1	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	42
4.2.1.2	Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase	47
4.2.1.3	Live/Dead Färbung	48
4.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	51
4.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie	53
4.2.4	Live Cell Imager	55
4.2.5	Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin	56
4.2.6	Aktivität von Enzymsystemen	59
4.2.6.1	Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP1A2-Aktivität	59
4.2.6.2	Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP3A4-Aktivität	60
4.2.7	Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) - indirekt	62
4.2.8	Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) - direkt	63
4.2.9	Apoptose	66
4.2.9.1	DNA-Fragmentierung	66
4.2.9.2	Charakterisierung des CD95-Rezeptors	68
4.3	Test-Validierung mit primären isolierten Hepatozyten	70
4.3.1	Bestimmung der Harnstoff- und Albuminkonzentration	70
4.3.2	Zellvitalität - MTT Assay	70

4.3.3	EROD-Assay und Proteinbestimmung	73
4.4	Zusammenfassung	74
4.4.1	Liposomales Amphotericin B	74
4.4.2	Anidulafungin	75
4.4.3	Caspofungin	76
4.4.4	Fluconazol	77
4.4.5	Voriconazol	78
5	DISKUSSION	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	104

II. Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
AL	Arbeitslösung
ALV	Akutes Leberversagen
ANI	Anidulafungin
AmB	Amphotericin B
AMG	Arzneimittelgesetz
ATCC	American Type Culture Collection

B

BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

CLI	chronisches Leberversagen
CASPO	Caspofungin
CD95	Cluster of differentiation 95
C _{max}	maximale Medikamentenkonzentration
CMV	Cytomegalievirus
CPD	Kritische-Punkt-Trocknung
CYP	Cytochrom P450

D

Da	Dalton
DIN EN	DIN = Deutsche Industrie Norm, EN
ISO	= Europäische Norm, ISO = International Organisation for Standardisation
DGKC	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie

dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DILI	Drug induced liver injury
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

E

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMZ	Elektronenmikroskopiezentrum
EROD	Ethoxyresorufin O-Deethylase

F

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAS	Fibroblast associated
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fetales Kälber-Serum
FLUCO	Fluconazol
FSC	Forward Scatter

G

g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
GFP	Green fluorescent protein
GLP	Good Laboratory Practice
GSH	Glutathion

H

h	Stunde
---	--------

HBV	Hepatitis B-Virus	min	Minute
HDL	High-Density-Lipoprotein	ml	Milliliter
HE	Hepatische Enzephalopathie	mmol	Millimol
HELLP	Hämolysis elevated liver enzymes low platelet count	MRD	Milliarden
HHMM	Human Hepatocyte Maintenance Medium	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
HIV	Human Immunodeficiency Virus	MW	Mittelwert
HRP	Horseradish, Meerrettichperoxidase	N	
HSV	Herpes simplex-Viren	NaCl	Natrium-Chlorid
I		NADH	Nicotinamadenindinukleotid
IDR	Idiosyncratic drug Reaction	NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinoneimine
IE	Internationale Einheiten	ng	Nanogramm
IgG	Immunglobulin G	nm	Nanometer
IL	Interleukin	NSAR	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
ITS	Intensivstation	O	
INR	International Normalized Ratio	OD	Optische Dichte
K		P	
Kg	Kilogramm	p	Piko
L		p	p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
I	Liter	PBS	Phosphate Buffered Saline
L-AmB	Liposomales Amphotericin B	PCB	Polychlorierte Biphenyle
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PCM	Paracetamol
LED	Light-emitting diode	PCR	Poly Chain Reaction
LDL	Low-Density-Lipoprotein	pH	potentia hydrogenii
M		PI	Propidiumiodid
M	Marker	pmol	Pikomol
MA	Mikroalbumin	PMS	Phenazinmethosulfat
max.	maximal	R	
mg	Milligramm	REM	Rasterelektronenmikroskopie
		RNA	Ribonucleic acid (englisch)

RT	Raumtemperatur	X	
ROI	Reactive Oxygen Intermediates	XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
ROS	Raggruppamento Operativo Speciale		
S		Z	
s	Sekunde	z.B.	zum Beispiel
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ZNS	Zentralnervensystem
SSC	Side Scatter	z.T.	zum Teil
SL	Stammlösung		
STR	Short tandem repeats	§	Paragraph
		<	kleiner
T		>	größer
Tab.	Tabelle	°C	Grad Celsius
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring	%	Prozent
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase	3-MC	Methylcholanthren
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie	2D	Zweidimensional
TMB	Tetramethylbenzidin	3D	Dreidimensional
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha	7-BFC	7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling	7-HFC	7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin
		v/v	Volume to Volume
U			
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung		
UDP	un-degradable protein		
USD	US-Dollar		
U/l	Unit pro Liter		
μ g	Mikrogramm		
μ l	Mikroliter		
μ mol	Mikromol		
usw.	und so weiter		
W			
WHO	Weltgesundheitsorganisation		

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Vereinfachte Darstellung des Arzneimittelentwicklungsprozesses	7
Abb. 2 Wirkmechanismen systemischer Antimykotika	15
Abb. 3 Belegung einer 24-Well-Platte	25
Abb. 4 Umwandlung von Ethoxyresorufin zu Resorufin	31
Abb. 5 Schema der Bildung von reduziertem Formazan-Farbstoff (XTTred)	33
Abb. 6 Detektion der 3'-OH-Enden durch TUNEL-Färbung und FACS-Analyse	36
Abb. 7 Detektion der CD95-Rezeptorexpression	37
Abb. 8 Darstellung der Zellzahlen/ml in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	43
Abb. 9 Darstellung der Vitalität [%] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	44
Abb. 10 A Darstellung der Zellzahl/ml von Anidulafungin und B Darstellung der Vitalität [%] von Anidulafungin. Auf der x-Achse sind C_{max} (2,25 mM), 5x C_{max} (11,25 mM), 10x C_{max} (22,5 mM) im Medium, sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	45
Abb. 11 A Darstellung der LDH-Werte [U/l] nach 3 Tagen und B nach 6 Tagen in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	47
Abb. 12 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100-fach Vergrößerung) der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A mit A Kulturmedium + 10% FKS (Negativkontrolle) und B Paracetamol 15,24 mM Medium (Positivkontrolle)	49
Abb. 13 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100-fach Vergrößerung) der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A in der C_{max} -Konzentration im Medium mit A 5,7 mM Liposomales Amphotericin B B 2,25 mM Anidulafungin C 0,2 mM Caspofungin und (D) 4,5 mM Fluconazol	50
Abb. 14 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A mit A Liposomales Amphotericin B, 10x C_{max} (57,25 mM), Medium, 40-fach Vergrößerung B Fluconazol, 10x C_{max} (45 mM), Medium, 40-fach Vergrößerung C Anidulafungin, 5x C_{max} (11,25 mM), Medium, 200-fach Vergrößerung. Es wurde keine Quantifizierung durchgeführt.	51
Abb. 15 REM-Aufnahmen von HepG2/C3A	52

Abb. 16 TEM-Aufnahmen A eines HepG2/C3A-Monolayer	54
Abb. 17 TEM-Aufnahmen eines Hepatozyten.....	54
Abb. 18 Darstellung einer 24 h Verlaufsbeobachtung von einem Well einer 24-Well mit 500.000 Zellen. (A-C) Inkubation mit 10 % Kulturmedium, A Beginn nach 4 h Adhärenz der HepG2/C3A, B Aufnahme nach 12 h, C Aufnahme nach 24 h (D-F) Inkubation mit 10-facher C_{max} -Konzentration (22,5 mM) von Anidulafungin in 10 % Kulturmedium, D Beginn nach 4 h Adhärenz, E Aufnahme nach 12 h, F Aufnahme nach 24 h 40-fach Vergrößerung.....	55
Abb. 19 Darstellung der Adhärenzbestimmung von A der Negativkontrolle, B von Paracetamol, (15,24 mM, Medium), C von Fluconazol, (4,5 mM C_{max} -Konzentration, Medium).....	56
Abb. 20 Darstellung von Mikroalbumin [mg/l] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	57
Abb. 21 Darstellung von Mikroalbumin [mg/l] von A Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B vom Liposomalen Amphotericin B (5,7 mM, 28,62 mM, 57,25 mM). Es sind C_{max} , 5x C_{max} , 10x C_{max} -Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen	58
Abb. 22 Darstellung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin [pmol/l]) in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen.....	60
Abb. 23 Darstellung der Umsetzung von 7-BFC zu 7-HFC [pmol/l] von A Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM). Es sind C_{max} , 5x C_{max} , 10x C_{max} -Konzentration im Medium, sowie eine neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen	61
Abb. 24 Darstellung von XTT-direkt, [Extinktion/Well] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen.....	64
Abb. 25 Darstellung von XTT-direkt [Extinktion/Well] von A Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B vom Liposomalen Amphotericin B (5,7 mM, 28,62 mM, 57,25 mM). Es sind C_{max} , 5x C_{max} , 10x C_{max} -Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen	65
Abb. 26 Darstellung der TUNEL-positiven Zellen [%] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) 2,25 mM ANI (Anidulafungin) 0,2 mM CASPO (Caspofungin) 4,5 mM FLUCO (Fluconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen	67
Abb. 27 Darstellung der TUNEL-positiven Zellen [%] von A Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM). Es sind C_{max} , 5x C_{max} , 10x C_{max} -Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen	68

Abb. 28 Darstellung der CD95-Rezeptor-positiven Zellen [%] von Anidulafungin (2,25 M, 11,25 mM, 22,5 mM). Es sind C_{max} , $5x C_{max}$, $10x C_{max}$ -Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen	69
Abb. 29 MTT-Assay mit primär isolierten Hepatozyten nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen. Auf der y-Achse sind die erreichten Farbstoffumsätze der Zellen als Extinktionswerte (optische Dichte=OD) und auf der x-Achse sind C_{max} , $5x C_{max}$ und $10x C_{max}$ von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) Paracetamol (1,52 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM), pos. (2 % Troton X-100) und Ethanol-Lösungsmittel-(EtOH) Kontrolle aufgetragen.	72
Abb. 30 Induktion der CYP1A2-Aktivität in humanen Hepatozyten in 24- Well-Platten bei Substanzgabe für 48 h von Tag 3 bis 5 der Kultur. Auf der y-Achse sind die erreichten umgesetzten Resorufinmengen [pmol/ml/60min] und auf der x-Achse sind C_{max} , $5x C_{max}$ und $10x C_{max}$ von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) Paracetamol (1,25 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM) und pos. (25 μ M β NF) Kontrolle aufgetragen.....	73
Abb. 31 Induktion der CYP1A2-Aktivität in humanen Hepatozyten in 24well Platten bei Substanzgabe für 48 h von Tag 3 bis 5 der Kultur. Auf der y-Achse sind die erreichten umgesetzten Resorufinmengen [pmol/ml/60min] und auf der x-Achse sind C_{max} , $5x C_{max}$ und $10x C_{max}$ von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) Paracetamol (1,25 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM) und pos. (25 μ m β NF) Kontrolle aufgetragen.....	74

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der Ursachen für akutes Leberversagen	2
Tab. 2 Prüfmuster zur qualitativen Beurteilung von Veränderungen der Zellmorphologie durch zytotoxische Wirkungen	8
Tab. 3 Vorteile und Nachteile verschiedener in vitro- Metabolisierungssysteme.....	10
Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Antimykotika mit ihren Eigenschaften	14
Tab. 5 Übersicht der verwendeten Antimykotika	21
Tab. 6 Beschreibung des siebentägigen Testablaufes.....	26
Tab. 7 Herstellung der Stamm-, Arbeits- und Gebrauchslösungen für die Testsubstanzen	38
Tab. 8 Messwerte der Funktionsüberprüfung zum Aufbau der Masterzellbank	41
Tab. 9 Übersicht über Zellzahl/ml und Vitalität [%] der Plasmaversuche der verwendeten Testsubstanzen,	46
Tab. 10 Zellmorphologie-Beschreibung anhand der Live/Dead-Aufnahmen antimykotikabehandelte Zellen im Medium.....	49
Tab. 11 Messwerte der indirekten XTT-Bestimmung [Extinktion/Well] im Medium und Plasma der verwendeten Antimykotika.....	62
Tab. 12 Zellmorphologie humaner Hepatozyten in 24Well Platten.....	71
Tab. 13 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) vom Liposomales Amphotericin B von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium	75
Tab. 14 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Anidulafungin von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium.....	76
Tab. 15 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Caspofungin von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium.....	77
Tab. 16 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Fluconazol von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium.....	78
Tab. 17 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Voriconazol von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium.....	79

1 EINLEITUNG

1.1 Leberversagen

Die Leber verfügt über eine große Reservekapazität in der Ausübung vieler ihrer Funktionen wie Proteinsynthese, Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktion. Jedoch kommt es durch Beeinträchtigung der Leberfunktion (Leberinsuffizienz, Leberdysfunktion, Leberversagen) zu Funktionsstörungen der Leber bis hin zu einem akut lebensbedrohlichen Zustand beim Leberversagen [3, 4].

Bei Intensiv (ITS)-Patienten kann sowohl ein primäres als auch ein sekundäres Leberversagen auftreten [2, 5–7]. Bei Systemerkrankungen mit schweren Verläufen wie z.B. Sepsis SIRS im Rahmen einer Pankreatitis, kann aus einer Leberdysfunktion ein sekundäres Leberversagen hervorgehen, welches die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtert [8–11]. Vorwiegend Patienten mit einem septischen Schock oder einer schweren Sepsis entwickeln zu 19-22 % eine Leberdysfunktion bis hin zum Leberversagen [12]. In Abhängigkeit von der Ätiologie und den Komplikationen eines akuten Leberversagens beträgt die Mortalität der Patienten 20 bis 80 % [13–16]. Weiterhin können aus einer Leberdysfunktion weitere zahlreiche Beeinträchtigungen anderer Organsysteme resultieren, die letztendlich zu einem Multiorganversagen führen können [15, 17, 18]. Eine prospektive Multizenterstudie stellte fest, dass die frühe Leberdysfunktion bei ITS-Patienten als der bedeutsamste mortalitätsrelevante Faktor, selbst nach Korrektur für andere Organversagen darstellt. Die Inzidenz bei ITS-Patienten mit einer frühen Leberdysfunktion (Serum-Bilirubin > 36,4 µmol/l; 48 h nach Aufnahme) beträgt etwa 11 % [19].

Zu den primären Ursachen des Leberversagens gehört die Entwicklung einer Leberinsuffizienz auf die Progression einer lang vorbestehenden Lebererkrankung. In dem Fall spricht man von einem **chronischen Leberversagen (CLI)**. Ein Beispiel dafür ist ein jahrelanger Alkoholmissbrauch durch den immer mehr Leberzellen zerstört werden und das Gewebe vernarbt. In manchen Fällen nimmt auch eine chronische Virusinfektion wie die Hepatitis C einen schweren Verlauf und mündet letztlich in einem Leberversagen [19]. Als „**akut-auf-chronisches Leberversagen**“ bezeichnet man die Rekrudescenz einer bereits bestehenden Lebererkrankung, die im Rahmen einer Infektion (z.B. Pneumonie, spontanbakterielle Peritonitis), schwerer gastrointestinale Blutungen oder durch Rekrudescenz der Grunderkrankung (z.B. alkoholische Hepatitis oder akuter Schub einer chronischen Hepatitis B) resultieren [6, 20, 21]. Die 30-Tage-Mortalität ist hoch und beträgt etwa 50 bis 66 % [14, 22]. Das **akute Leberversagen (ALV)**, ein seltenes lebensbedrohliches Krankheitsbild mit plötzlichem Funktionsverlust ohne bevorstehender Lebererkrankung oder schwere akute Störung der metabolischen Leberfunktion mit eingeschränkter Synthese-/ Detoxifikationsfunktion. Einerseits kann das ALV als hepatische

Erkrankung, andererseits allerdings auch als Folgeerkrankung anderer pathologischer Vorgänge im Körper auftreten. Epidemiologisch kommt dies deutlich seltener als das CLI vor, etwa 200 bis 500 Menschen entwickeln in Deutschland jährlich ein ALV. Wobei die Daten aus Deutschland rar und weitestgehend retrospektiv erhoben worden sind [23]. Klinisch definiert sich das ALV im engeren Sinne, z.B. als Komplikation einer Hepatitis oder einer Vergiftung durch die Trias: Koagulopathie, Ikterus und hepatische Enzephalopathie (HE) [24]. Das Krankheitsbild ALV ist entsprechend seiner zeitlichen Entwicklung in Subtypen unterteilt. Dabei unterscheidet der Zeitraum zwischen Auftreten Ikterus und HE das akute (Zeitraum < 2 Wochen) vom subakutem (Zeitraum > 2 Wochen) Leberversagen. Eine andere Einteilung nach O'Grady definiert ein hyperakutes (0-7 Tage), ein akutes (8-28 Tage) und ein subakutes Leberversagen (29-72 Tage) [25, 26]. Wie in Tab. 1 gezeigt, sind die Ursachen für ein akutes Leberversagen vielfältig, wobei jedoch die Virushepatitiden, Medikamente und Vergiftungen die Rangliste anführen. Jedoch bleibt in bis zu 20 % der Fälle der Auslöser der Leberentzündung unklar (**kryptogene Hepatitis**), die letztlich zum Leberversagen führen kann [27–29].

Tab. 1 Einteilung der Ursachen für akutes Leberversagen [1, 2]

Infektionen	- Virushepatitiden A-E, wobei auch HBV-HDV-Doppelinfektionen - Gelbfieberevirus, CMV, EBV, HSV, Q-Fieber, Tuberkulose
Hepatotoxine	- Medikamente: Paracetamol, Halothan, Isoniazid, Ketoconazol, Tetrazykline - Alkohol und Drogen (Ecstasy) - Knollenblätterpilz (<i>Amanita phalloides</i>) - Chemikalien: Tetrachlorkohlenstoff, Lösungsmittel
kardiovaskuläre Ursachen	- Rechtsherzversagen, Pfortaderthrombose, Kreislaufschock - Buddi-Chiari-Syndrom
metabolische Ursachen	- Morbus Wilson - akutes Schwangerschaftsleber, HELLP-Syndrom - Reye-Syndrom Galaktosämie, hereditäre Fruktoseintoleranz
andere Ursachen	- massive Lebermetastasierung, Autoimmunhepatitis, Leberteilresktion

Für die Prognose sind das Intervall zwischen Auftreten des Ikterus und der HE, das Ausmaß der HE, sowie das Alter des Patienten und die Ursache des Leberversagens von großer Bedeutung [30].

1.2 Hepatotoxizität durch Arzneimittel

Die Anwendung eines wirksamen Arzneimittels ist auch mit dem Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) verbunden. Dieser Dualismus zeigt sich auch in der Etymologie des Wortes „pharmakon“, das neben „Arzneimittel“ auch „Gift“ bedeutet [31]. Aktuelle Daten aus Deutschland, Frankreich, Australien und USA belegen, dass bis zu 20 % aller Krankenhaus-

aufnahmen auf eine UAW einer Pharmakotherapie beruhen [32]. Jede zehnte UAW betrifft die Leber [21, 33, 34]. Die medikamenten-induzierte Hepatotoxizität („Drug-Induced Liver Injury“ - DILI) ist laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als eine Arzneimittelnebenwirkung oder -wirkung definiert, die vorwiegend die Leber betrifft und funktionelle und strukturelle Veränderungen durch Fremdstoffe verursacht. Eine DILI kann bis zum fortgeschrittenen Leberversagen führen und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Aufgrund dessen gehört Hepatotoxizität durch Arzneimittel zu den häufigsten Medikamenten-induzierte Todesursachen, da bei mehr als 75 % der Patienten trotz Behandlung eine ALV tödlich verläuft.

Die Leber gilt als Hauptorgan der Manifestation arzneimittelbedingter Nebenwirkung, da dieses Organ eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von Fremdsubstanzen spielt und wichtig für den Arzneimittelstoffwechsel ist [35–37]. Als primär hepatotoxisch nennt man Substanzen, die bereits in unveränderter Form toxisch bei der Leberpassage wirken. Während latent hepato-toxisch wirkende Substanzen ihre Hepatotoxizität sekundär nach ihrer Metabolisierung entfalten. Bei zwei Drittel der medikamentös induzierten Fälle ist der unsachgemäße Gebrauch von Paracetamol (PCM) für das ALV verantwortlich, das letzte Drittel entfällt auf andere Arzneistoffe, insbesondere Antibiotika und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) [38]. Zu den gefährlichsten Arzneimittelgruppen zählen in absteigender Reihenfolge: Zytostatika, Kardika, Antikoagulanzen, Antidiabetika und NSAR [39].

1.2.1 Klassifikation

Die arzneimittelbedingten Leberschäden werden in die idiosynkratische (unvorhersehbare) und die toxische (vorhersehbare) Form unterschieden [40].

Der **idiosynkratische Typ** ist eher selten. Dabei zeigt sich keine direkte, sondern eine indirekte unvorhersehbare Leberschädigung bei normaler Dosierung eines Arzneimittels. Man unterscheidet zwischen einer immunologischen (Symptomeintritt nach einer bis fünf Wochen) und einer metabolischen Wirkung (Anzeichen meist nach wenigen Tagen), abhängig von der Reaktion des Organismus auf die Einnahme des Medikamentes. Die idiosynkratische Toxizität lässt sich jedoch aufgrund ihrer seltenen Inzidenz von 1:10.000 bis 1:100.000 Patienten häufig erst nach Markteinführung entdecken, da bis zur Zulassung selten mehr als einige Tausend Patienten längere Zeit mit einem neuen Wirkstoff behandelt worden sind [41, 42].

In erster Linie zeigt sich der **toxische Typ**, bei dem die leberschädigende Wirkung des Medikaments eindeutig kalkulierbar ist. Der Einfluss auf die Leber ist vorhersehbar, dosisabhängig und tritt direkt ein. Es kommt zu einer Schädigung der Hepatozyten (Nekrose mit Zelluntergang, Leberzellverfettung = Steatose) oder von Zellen des Gallengangs. Es gibt Medikamente wie Isoniazid, Mercaptopurin, Methotrexat, Tetracyclinen und Paracetamol (PCM), die durch Überdosierung eine vorsehbare toxische Leberschädigung bewirken [36, 37, 43].

Paracetamol als Modellsubstanz für Hepatotoxizität

Aufgrund seiner guten Verträglichkeit ist PCM eines der bekanntesten, nicht-verschreibungspflichtigen Schmerz- und Fiebertmittel und gilt besonders in der Pädiatrie als Standardtherapeutikum. Jedoch ist PCM schon seit Langem als hepatotoxische Substanz bekannt. PCM verfügt über eine geringe therapeutische Breite und kann somit zu einer toxininduzierten Leberschädigung und einem ALV durch die Überschreitung der als ungefährlich geltenden Tageshöchstdosis von 4 g [44, 45] führen. Die Höchstdosis muss dem Patienten angepasst werden, da die Dosisverträglichkeit mit zunehmender vorbestehender Leberschädigung und in Abhängigkeit verschiedener Parameter [21, 23, 46], wie z.B. bei chronischem Alkoholkonsum (Induktion von CYP2E1), bei Patienten mit Herzinsuffizienz (verminderte Glutathion (GSH)-Spiegel), Morbus Gilbert (verminderte Glukuronidierung) oder bei Unterernährung und langem Fasten (verminderte Glukuronidierung), abnimmt.

Die Überdosierung kann unbeabsichtigt, durch Langzeitmedikation, durch kombinierte Einnahme mehrerer paracetamolhaltiger Medikamente, was bei 50 % der Patienten zutrifft, oder in suizidaler Absicht verursacht sein [21, 47]. Bei der Metabolisierung wird PCM durch Konjugation zu Glucuronsäure (65 %) und Sulfatester (35 %) eliminiert und zu etwa 5 % unverändert ausgeschieden [48]. Weniger als 5 % des PCM wird durch das Cytochrom-P450-System (CYP2E1, -1A2 und -3A4) metabolisiert. Dabei entsteht der hochreaktive und kurzlebige Metabolit N-Acetyl-p-Benzochinonimin (NAPQI) [49, 50]. Dieser Metabolit wird durch GSH unter Bildung von Mercaptursäure entgiftet und anschließend renal eliminiert [51]. Bei einer PCM-Überdosierung kommt es zur Sättigung der Glukuronidierung und Sulfatierung und dadurch zur verstärkten Bildung von NAPQI durch das Cytochrom (CYP)-System. Durch die Entgiftung von NAPQI kommt es zum vollständigen Verbrauch des zellulären GSH-Kontingents. Anschließend kommt es zur kovalenten Akkumulation von überschüssigem NAPQI an hepatische Proteine und Enzyme, die für die toxische Wirkung sorgen [52–54]. Die PCM-Hepatotoxizität ist sehr gut charakterisiert [55]. Zahlreiche Studien geben Hinweise darauf, dass eine PCM-Überdosierung zu oxidativen Stress [56, 57] in den Zellen, zu Transkriptionsveränderung, sowie zu Induktion von proinflammatorischen [58, 59] und apoptotischen [60] Signalwegen führt. Allerdings sind der exakte Mechanismus der PCM-Toxizität sowie seine involvierten Reaktionswege noch nicht vollständig geklärt.

1.2.2 Mechanismen der Hepatotoxizität / Biotransformation

Der Organismus hat zwei Abwehrsysteme: einerseits das Immunsystem und andererseits das CYP450-System. Die Aufgabe vor Fremden zu schützen, erfüllen die Systeme meist gut, jedoch sind sie auch für viele hepatische Nebenwirkungen von Medikamenten verantwortlich [41].

Aktuell sind mehrere molekulare Mechanismen, die Leberschäden hervorrufen, bekannt. Arzneimittel sind kleine organische Moleküle und sind aufgrund dessen unfähig eine direkte Immunabwehr des Körpers hervorzurufen. Viele hepatozelluläre Reaktionen führen über das CYP450 zu Substanzveränderungen. Beim Arzneistoffmetabolismus durch das CYP450 können reaktive Zwischenprodukte (reaktive Metabolite, reaktive Sauerstoffradikale (ROS), freie Radikale) entstehen, die Ionenpumpen, Transporter, ungesättigte Lipide, Proteine und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) attackieren [61]. Durch kovalente Bindung an DNA oder Proteine, kann es zur Erzeugung funktionsunfähiger Enzyme kommen. Körpereigene Schutzmechanismen können solche Zwischenprodukte entgiften, bevor die Zellen zu Schaden kommen. Zu toxischen Auswirkung kommt es erst dann, wenn die körpereigenen Schutzmechanismen überfordert werden. Die entsprechende Immunantwort kann zur Lyse von Zellen führen. Das am besten dokumentierte Beispiel für einen durch einen reaktiven Metaboliten ausgelösten Leberschaden ist PCM [62]. Außerdem sind die entstanden körperfremden Arzneimittel-Protein-Verbindungen groß genug, um als potenzielles Ziel von der Immunabwehr des Körpers zusätzlich erkannt zu werden. Durch die Präsentation der Verbindung durch Antigen-präsentierende Zellen an der Hepatozytenaußenseite kommt es zu einer immunologischen Antwort über Zytokine und T-Zellen [63]. Klassisches Beispiel ist das Anästhetikum Halothan. Bei etwa 1:10.000 anästhesierten Patienten tritt nach der ersten Exposition eine Leberschädigung auf. Nach Mehrfach-Expositionen ist die Hepatotoxizität viel häufiger. Im Serum von Patienten mit schwerer Halothan-Hepatitis finden sich Antikörper gegen durch das Anästhetikum modifizierte Protein, die die Hepatozyten lysieren. Andere Arzneimittel aktivieren apoptotische Pfade, in dem sie über den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) intrazelluläre Caspase-Kaskaden aktivieren, die durch den Abbau von Chromatin im Zellkern den programmierten Zelltod auslösen [64]. Störungen der β -Oxidation führen zu einer mikrovesikulären Steatose, die ein morphologisches Charakteristikum einer mitochondrialen Funktionsstörung darstellt [41]. Es kommt zur Beeinträchtigung der Energieproduktion der Zelle und der Mitochondrienfunktion durch die Behinderung der β -Oxidation sowie durch den negativen Einfluss auf die Proteine der Atmungskette. Durch die Beeinträchtigung der Funktion der Atmungskette kann es vermehrt zur Bildung von ROS kommen, die direkt die mitochondriale DNA schädigen können. Weiterhin kann durch die Arzneimittelwirkung auf die β -Oxidation die Fettsäuren-Metabolisierung limitiert werden, was eine Anreicherung von Lactat und Triglyceriden und damit die Verfettung der Leber zur Folge hat [65]. Cholestase ist eine häufige Manifestation medikamentös-toxischer Leberschäden und wird durch Medikamente verursacht, die durch einer Inaktivierung von Ionenpumpen und anderen Transportproteinen den Gallenfluss behindern [66]. Folglich kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von potentiell toxischen hydrophoben Gallensäuren, die zur Apoptose führen. Viele Arzneistoffe, insbesondere deren Metabolite, bilden Coenzyme-A-Ester und sequenzieren das Coenzym-A (CoA), welches für die Oxidation von endogenen Substraten nicht mehr zur

Verfügung steht. Klinisch äußert sich diese mitochondriale Störung oft in Form einer Laktatidose oder einer Hyperammoniämie. Ob in erster Linie oxidativer Stress, die Freisetzung von Zytokinen aus Kupffer-Sternzellen, die Hemmung von Ionen-pumpen oder/und einer Perfusionsstörung für resultierende Apoptose und Apoptose der Hepatozyten verantwortlich ist, wird weiterhin diskutiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist eine Kombination dieser Prozesse ausschlaggebend für den Leberschaden [67].

Fremdstoffmetabolismus und Cytochrom P450-Enzyme

Der größte Teil der Arzneistoffe ist lipophil und damit in der Lage, Zellmembranen einem Konzentrationsgefälle folgend zu passieren. Über die Niere werden Fremdstoffe hauptsächlich in wasserlöslicher Form ausgeschieden. Aufgrund dessen ist die Umwandlung der lipidlöslichen zugeführten Fremdstoffe in wasserlösliche Metabolite notwendig. Für die meisten Fremdstoffe läuft die Biotransformation in der Leber in drei Phasen ab [68]. Alle drei Phasen haben dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität von Substanzen, da sie sowohl zur Toxifizierung als auch Detoxifizierung führen können [69, 70]. Bei der Funktionalisierung, Phase-I, werden lipophile Stoffe in Oxidations-, Reduktions- oder Hydrolysereaktionen in polare, hydrophile Verbindungen umgewandelt bzw. polare Gruppen freigelegt [71]. Die wichtigsten Enzyme des Phase-I-Stoffwechsels sind die CYP450-abhängigen mischfunktionellen Monooxygenasen. Die CYP450 Monooxygenasen sind hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum von Leberzellen und in Darmgewebe aber auch in anderen Organen, wie Lunge, Niere, Hodengewebe, Gehirn etc., exprimiert [72]. Die CYP-Superfamilie besteht aus mikrosomalen Hämoproteinen. Die CYP-Enzyme oxygenieren das Substrat, dadurch wird die Elimination verbessert und die Lipidlöslichkeit des Substrates vermindert. Gleichzeitig findet eine Reduktion von Sauerstoff statt. Aufgrund der Doppelfunktion (Oxidation des Substrats und Reduktion von Sauerstoff) werden die CYP-Enzyme als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet. Die Klassifizierung der P450 Monooxygenasen erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenzidentität [73]. Einige der Phase-I-Metabolite selbst sind pharmakologisch wirksam bzw. die Metabolite selber stellen das eigentliche Wirkprinzip dar („Prodrug“). In der Regel schließt sich an den Metabolisierungsschritt der Phase-I die Konjugationsreaktionen der Phase-II mit körpereigenen Liganden an. Um eine ausreichende Hydrophilität für die Ausscheidung der Substanzen zu erreichen, werden die polaren Produkte von Glutathion-, UDP-Glukuronosyl, Sulfo-, Acetyl- und Methyltransferasen mit funktionellen Gruppen z.B. mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. In Phase III werden die Substanzen aktiv aus den Hepatozyten transportiert und anschließend über das renale oder biliäre System ausgeschieden [74].

1.3 Toxikologische Testungen von Medikamenten

1.3.1 Allgemeine toxikologische Testung

In Deutschland wurden neue Arzneimittel bis 1977 lediglich bei der zuständigen Bundesbehörde registriert. Seit dem 01.01.1978 muss ein Präparat ein durch das 2. Arzneimittelgesetz (AMG) vorgegebenes Zulassungsverfahren durchlaufen [75, 76]. Die Hersteller sind verpflichtet, pharmazeutische Qualität, therapeutische Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Arzneimittel vor der Zulassung nachzuweisen. Jedoch können vor der Zulassung eines Arzneimittels nicht alle potenziellen UAWs beobachtet und quantifiziert werden. Bis zur Markteinführung wird geschätzt, dass am Anfang dieses etwa 10 Jahre dauernden Prozesses 10.000 bis 25.000 chemische Substanzen für die Arzneimittelentwicklung getestet werden und Entwicklungskosten von etwa einer Mrd. € entstehen [77, 78]. Die Entwicklung eines Arzneimittels bis hin zur Zulassung kann nach Identifizierung wirksamer chemischer Substanzen grob in zwei Entwicklungsabschnitte unterteilt werden: die präklinische und klinische Entwicklung (Abb. 1). Die Arzneimittelkandidaten werden in der präklinischen Entwicklung bezüglich ihrer pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften mit Hilfe von in vitro- als auch in vivo-Methoden an verschiedenen Tierarten untersucht. Grundsätzlich prüft man abhängig von der erwarteten Latenzzeit auf akute, subchronische, chronische Toxizität, sowie auf Reproduktions- und Genotoxizität. Die akute-, subchronische-, chronische- und Reproduktionstoxizität wird in Tierversuchen (in vivo) an Mäusen und Ratten durchgeführt. Die Genotoxizität kann in Zellkulturversuchen (in vitro) geprüft werden.

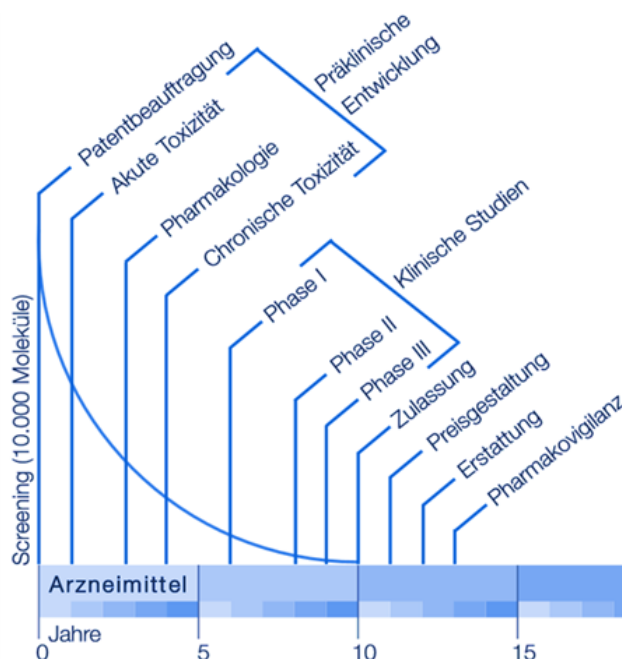


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung des Arzneimittelentwicklungsprozesses. [78]

Aufgrund der Vielzahl möglicher Ansätze zur Messung der Zytotoxizität, wird zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit z.B. bei der Zulassung von Arzneimitteln die DIN EN ISO 10993-5

verwendet. Allerdings werden von der ISO-Norm keine bestimmten Methoden und Testsysteme vorgeschrieben. Es werden lediglich Empfehlungen bestimmter Testmethoden und Testparameter dargestellt. Zur Testung der Zytotoxizität können qualitative und quantitative Testmethoden verwendet werden. Die ISO-Norm bevorzugt quantitative Methoden. Qualitative Methoden sind durchaus für ein Screening geeignet. Generell werden die Messparameter der Zytotoxizität von der Norm in vier Bereiche aufgeteilt:

- Analyse der Zellschädigung anhand zellmorphologischer Veränderungen
- Messungen der Zellschädigung
- Messungen des Zellwachstums und
- Messungen spezifischer Faktoren des zellulären Metabolismus.

In der Tab. 2 ist ein Prüfmuster von der ISO-Norm zur einheitlichen Bewertung von Zellschädigungen-Analysen dargestellt, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten.

Tab. 2 Prüfmuster zur qualitativen Beurteilung von Veränderungen der Zellmorphologie durch zytotoxische Wirkungen [79]

Grad	Ausmaß	Zustand der Zellkultur
0	nichts	diskrete intrazytoplasmatische Granula, keine Zelllyse, keine Reduktion des Zellwachstums
1	leicht	nicht mehr als 20 % der Zellen sind rund, lose befestigt und ohne intrazytoplasmatische Granula oder zeigen Veränderungen in der Morphologie; gelegentlich sind lysierte Zellen vorhanden; nur geringe Wachstumshemmung
2	mild	nicht mehr als 50 % der Zellen sind rund und ohne intrazytoplasmatische Granula, keine umfangreiche Zelllyse; nicht mehr als 50 %ige Wachstumshemmung
3	mäßig	nicht mehr als 70 % der Zellschichten enthalten lysierte oder abgerundeten Zellen; Zellschichten sind nicht völlig zerstört, aber mehr als 50 %ige Wachstumshemmung
4	schwer	nahezu vollständige oder komplette Zerstörung der Zellschichten

Zusätzlich können z.B. Zellzahl, Freisetzung von Enzymen, Freisetzung von Vitalfarbstoffen, die Proteinmenge, Reduktion von Vitalfarbstoffen oder andere messbare Parameter quantifiziert werden [79]. Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Bestimmung von Ergebnissen in jeder dieser vier Kategorien. Dabei gilt es zu beachten, in welche Kategorie das verwendete Prüfverfahren gehört, um den Vergleich der Ergebnisse für ähnliche Produkte oder Materialien innerhalb des Laboratoriums als auch bei Ringversuchen zu gewährleisten.

Aus toxikologischer Sicht sollen Basisdaten zur Erstellung eines Nutzen-Risiko-Profiles gesammelt werden, die Voraussetzung für den Start einer klinischen Prüfung sind [80]. Durch die in-vivo Substanzuntersuchung in der präklinischen Phase hinsichtlich des Einflusses auf Organe, sowie deren Funktion bei verschiedenen Verabreichungsmengen und -dauern, kann die Grundlage für die Abwägung zwischen Nutzen und Risiko erfolgen. Zusätzlich zur Testung der

therapierelevanten Dosen wird auch die Wirkung z.T. wesentlich höherer Dosen (je nach Therapiegebiet 10- bis 50-fach über der therapeutischen Dosis) in unterschiedlich lang andauernden akuten, subakuten, subchronischen und chronischen Toxizitätsstudien untersucht [81]. Dadurch können Funktionsbeeinflussungen sowie Organschäden festgestellt werden, die verschiedene Ursachen haben können, wie z.B. die Metabolisierung der Substanz zu einem reaktiven Metaboliten, die Anreicherung in diversen Organen oder Geweben, usw. Die Substanz wird nicht klinisch getestet, wenn das resultierende Risiko im Vergleich zum Nutzen höher gewertet wird. Das Auftreten einer DILI ist eine sehr häufige Ursache für nicht weitere klinische Testungen eines Arzneimittelkandidaten und hat daher eine hohe Relevanz in der toxikologischen Forschung [77]. Jedoch weisen die etablierten Nachweismethoden viele Nachteile, wie Invasivität oder geringe Sensitivität auf. Eine frühere Detektion bzw. eine bessere Diagnose von Organtoxizität in vitro, speziell der DILI, würde die Entwicklungskosten senken. Zusätzlich kann von ethischem Wert die Anzahl an Versuchstieren in der Präklinik und auch das Risiko bei einer Anwendung am Menschen reduziert werden. Da viele Substanzen relativ spät im Entwicklungsprozess scheitern, treten Probleme meistens erst bei der ersten klinischen Anwendung am Menschen oder erst nach der Markteinführung auf. Die Ursache liegt in der Tatsache, dass Substanzwirkungen, die speziesspezifisch nur im Menschen und teilweise nur sehr selten z.B. innerhalb größerer Patientengruppen auftreten. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der toxikologischen Risikobeurteilung ist die Frage: Was ist ein akzeptables Risiko? Die Toxikologie kann hier nur Entscheidungsgrundlage schaffen.

International sind die klinischen Prüfungen in Studien der Phasen I bis IV unterteilt (CPMP 1995 a). In den Studien der ersten drei Phasen erfolgt die mehrfache Prüfung einer neuen Substanz. Hauptsächliche Ziele der einzelnen Studienphasen sind:

Phase I: Verträglichkeit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik,

Phase II: Nachweis der Wirksamkeit, Dosisfindung und in

Phase III: Nachweis von Wirksamkeit (multizentrisch, evidenzbasiert).

Nach Erhalt der Zulassung und der Markteinführung eines Arzneimittels werden in den Studien der Phase IV weitere Informationen zur Verträglichkeit, zur therapeutischen Effizienz, zu Langzeitbeobachtungen, insbesondere Erkennung seltener Nebenwirkungen und zur Optimierung von Therapieschemata gewonnen. Zur Überprüfung und Bestätigung des allgemeinen Nutzen-Risiko-Verhältnisses, der bisherigen Dosierungsempfehlungen, Identifizierung seltener unerwünschter Arzneimittelwirkungen und zum Vergleich der Wirksamkeit mit anderen Arzneimitteln werden weitere klinische Prüfungen durchgeführt [82, 83]. Selbst in Phase IV nach der Zulassung kommt es zum Auftreten gravierender unerwünschter Arzneimittelereignisse.

Im Folgenden werden die verwendeten Modellsysteme sowie die klassischen Parameter zur Detektion der Hepatotoxizität beschrieben.

1.3.2 Testung auf Hepatotoxizität

Die explizite Testung auf Hepatotoxizität ist laut dem AMG nicht vorgeschrieben, lediglich die Messung der allgemeinen Zytotoxizität. Allerdings werden im Rahmen der Pharmakokinetik Bestimmungen zur Metabolisierung der Arzneistoffkandidaten über CYP450 der Leber durchgeführt. Zum Verständnis und zur Untersuchung von Mechanismen, Abläufen und zugrundeliegenden Ursachen von substanzinduzierter Organschädigung wurden toxikologische Modelle entwickelt. Es handelt sich meist um Tierstudien, die mit einer gezielten Behandlung mit bereits bekannten Organtoxinen (Modellsubstanzen) durchgeführt werden [84]. In der präklinischen Entwicklung ist die Ratte als Modelltier für regulatorisch vorgeschriebene toxikologische Studien etabliert und wird daher in toxikologischen Modellen bevorzugt eingesetzt. Der Vorteil der in vivo-Versuche ist die Beurteilung einer Fremdstoffwirkung auf den Gesamtorganismus, während in vitro-Systeme meist nur ein monofaktorielles System darstellen, dass die verschiedenen physiologischen Interaktionen nicht berücksichtigt. Jedoch werden immer häufiger in vitro-Methoden verwendet, um neben eines experimentellen Zeit- und Kostenersparnisses zusätzlich die Reduzierung der Anzahl an benötigten Versuchstieren zu ermöglichen. Bei den verschiedenen in vitro-Testsystemen (siehe Tab. 3) werden relevante isolierte perfundierte Organe, isolierte und kultivierte Zellen (permanente Zellen) dieser Organe, subzelluläre Strukturen und isolierte Enzymen verwendet.

Tab. 3 Vorteile und Nachteile verschiedener in vitro- Metabolisierungssysteme [85–87]

Modellsystem	Vorteile	Nachteile
Isolierte perfundierte Leber	Enzymaktivität und Funktionen wie im in vivo-Organ, lobuläre Struktur erhalten	kurze Lebensdauer (2-3 h), Untersuchung nur weniger Stoffe, kein humanes Material, hoher Tierversbrauch
Leberschnitte	lobuläre Struktur und Enzymaktivität erhalten, Studien an Humanleber möglich	kurze Lebensdauer (6-48 h), hohe Variabilität zwischen einzelnen Schnitten, hoher Tierversbrauch
Primär isolierte Hepatozyten	definierte Enzymaktivität unter bestimmten Bedingungen für mehrere Tage, Induktion und Inhibition von metabolisierenden Enzymen möglich, Humanmaterial verfügbar	frühzeitige Veränderung des Phänotyps, Verlust des normalen Zell-Zell-Kontaktes (Kollagenase), aufwändige Präparation, unterschiedliche Qualität
Permanente Leberzelllinie	unbegrenzte Verfügbarkeit, definierte Enzymaktivität, humane Zellen verfügbar, CYP-Isoenzyme extra induzierbar	Genotyp ist instabil, verschiedene Enzymaktivitäten verringert oder nicht vorhanden
Transgene Zellen	unbegrenzte Verfügbarkeit, definierte Enzymaktivität durch Transfektion mit humanen CYP's	keine physiologischen Enzym Spiegel, nur für spezielle Fragestellungen geeignet

Subzelluläre Fraktionen (S9 Mix, Mikrosomen)	unbegrenzte Verfügbarkeit, Enzymaktivität, zytosolische Fraktion kann zugesetzt werden, humanes Material verfügbar	nur kurzzeitiger Einsatz möglich, Kofaktoren für Aktivität erforderlich, keine zytosolischen Phase II-Enzyme (Mikrosomen), intrinsische Zytotoxizität
---	--	---

Der „Goldstandard“ für in vitro Modelle für Studien zur Biotransformation sind primär isolierte humane Hepatozyten [88, 89]. Das HEPAC-System von der Firma Primacyt aus Schwerin ist ein standardisiertes und validiertes Serum-freies Zellkultursystem für die Langzeitkultur primär isolierter humaner Hepatozyten [90]. Prüfsubstanzen können hinsichtlich der Mikroalbumin-synthese, Cytochrom-Aktivität (z.B. CYP1A2, CYP3A4) und mitochondriale Funktion mit Hilfe von Tetrazolium-basierter Assays wie 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbro-mid, kurz MTT getestet werden. Andere zellbasierte Systeme wie z.B. den Firmen Millipore oder Pharmacelsus konzentrieren sich zusätzlich oder ausschließlich auf andere Parameter wie Bestimmung der Zellzahl und -vitalität oder Apoptose-Assays.

Hepatozyten sind komplexe, differenzierte Zellen, die mit ca. 75 % der Gesamtzahl der Leberzellen zahlenmäßig den wichtigsten Bestandteil der Leber darstellen. Die Leberparenchymzelle verfügt über das fast komplette für den Fremdstoffmetabolismus relevante Enzymmuster mit hoher Aktivität. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die zunehmende Dedifferenzierung der primären Hepatozyten mit anhaltender Kultivierungsdauer und der Verlust der organspezi-fischen Eigenschaften. Primär isolierte Hepatozyten haben anspruchsvolle Kulturbedingungen. Weiterhin kann die Gewebequalität aufgrund interindividueller und funktionaler Variation sowie durch die genetische Disposition des Spenders schwanken [91]. Weiterhin ist davon auszu-gehen, dass die Enzymaktivitäten bedingt durch Vorerkrankungen und/oder Medikation der Zellspender bereits beeinflusst werden. Bedingt der limitierten Verfügbarkeit der humanen Hepatozyten durch den Mangel an geeigneten Spenderorganen werden für Routineunter-suchungen häufig Nagetierzellen verwendet. Beim Arbeiten mit tierischen Hepatozytenkulturen ist die Wahl der verwendeten Tierspezies von großer Bedeutung. Dabei sind die Finanzier-barkeit, Praktikabilität und Übertragbarkeit auf den Menschen ausschlaggebend. Trotz ihrer kontinuierlichen Verfügbarkeit und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse besteht dabei das Risiko falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse. Hepatozyten anderer Spezies eignen sich nicht immer zur Analyse des Metabolitenspektrums, da sich die Expressionen fremdstoffmetabolisierender Enzyme zwischen den Spezies unterscheiden können [87, 92]. Daher werden zunehmend humane Leberhepatoma-Zelllinien verwendet, um Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zu den Tierversuchen zur Prüfung von Arzneimitteln nach § 2 des AMG zu etablieren. Die Zellen permanenter Zelllinien sind genetisch identisch, besitzen einen stabilen Phänotyp in Kultur und sind deshalb leicht zu standardisieren [93]. Etablierte Zelllinien sind ständig verfügbar und können z.B. bei Zellbanken kostengünstig erworben werden. Mit Hilfe von gentechnologischen Methoden

mit spezifischen Zelleistungen, wie z.B. CYP450-Isoenzyme oder auch mit deren Gendefekten, können Zelllinien zusätzlich ausgestattet werden. Im Gegensatz zu den in vitro-Methoden mit zweidimensionalen (2D) Leberzellkulturen oder Tierversuchen erlangen dreidimensionale (3D) Kultivierungs-Modelle eine zunehmende Bedeutung. Aufgrund des Verlusts organotypischer Zellfunktionen in 2D-Zellkulturen oder die Speziesunterschiede bei Tierversuchen, gibt es bisher kein zuverlässiges Modell für die Bestimmung der Hepatotoxizität. Die rasche Dedifferenzierung von Primärzellen in Well-Kulturen ist oft die Folge des Fehlens einer in-vivo-ähnlichen Umgebung. Die verwendeten 2D-Zellkulturen können die gut organisierte 3D-Struktur von Organen mit vielfältigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen nicht berücksichtigen [94]. Bei Lab-on-a-chip-Systemen werden z.B. Hepatozyten (Hepa-Chip) in einer in vivo ähnliche Umgebung unter Einsatz verschiedener Zelltypen in Kontakt mit Matrixproteinen über Mikrokanäle mit Medium kultiviert. Die Vergleichbarkeit des Ansatzes ist im Vergleich zu den komplexen 3D-Aufbau der Leber in vivo nur gering, aber eine Verbesserung zu statischen, nicht perfundierten 2D-Kulturen. Zur Stabilisierung von Phänotyp und Funktion der Hepatozyten ist die Kokultivierung mit nicht parenchymalen Zellen, wie Endothelzellen, erforderlich [95]. Durch den „Einbau“ z.B. von Endothelzellen als zusätzlichen Zelltyp ins System kann die Stoffwechselsituation in der Leber, sowie eine organähnliche 3D-Struktur, gut realisiert werden. Zur Anwendung für toxikologische Analysen sollten die 3D-Zellkulturen allerdings einfach handhabbar, parallelisierbar und zu Standardlaborautomation kompatibel sein. Weiterhin ist es wichtig, dass ein hoher Informationsgewinn im Vergleich zu konventionell in Mikrotiterplatten durchgeführten Zellkultur realisiert werden kann. Die Firma Bionas GmbH verbindet humane Zellkultursysteme mit Siliziumchips und setzt dieses kombinierte System zu pharmakodynamischen, zytotoxischen und/oder metabolischen Untersuchungen ein [96]. Erste High-End Testsysteme, wie 3D-Leberzellkultur-chips, wurden 2006 von L. Griffith demonstriert [97]. Dabei werden Spheroide aus Hepatozyten und Endothelzellen in siebartigen Mikrostrukturen angesammelt und perfundiert. Allerdings ist die 3D-Struktur des Leberzellspheroid nicht geeignet, die geordnete Feinstruktur eines in vivo Lebersinusoids nachzubilden. Zu den Proliferations- und Differenzierungs-parameter sind die Systeme in der Lage Aussagen zum Zellstoffwechsel, wie extrazelluläre Ansäuerungsleistung, Zelladhäsion, Sauerstoffverbrauch, Albumin- und Harnstofffreisetzung usw., zu bestimmen.

Trotz dieser Entwicklungen sind konventionelle Zellkultursysteme als komplexe Biosensorsysteme bisher unverzichtbar.

1.4 Antimykotika

Die Inzidenz der Pilzinfektionen ist in den 90er Jahren angestiegen. Seit dem Jahr 2000 stagniert die Anzahl auf einem klinisch akzeptablen Niveau. Jedoch rutschten die Mykosen in der Todesursachenstatistik vom zehnten auf den siebten Platz. Besonders auf den Intensivstationen steigt der Anteil nosokomialer Infektionen, die durch fakultativpathogene Pilze hervorgerufen werden, seit mehr als zehn Jahren stetig an [98, 99]. Derzeit wird fast jede zehnte Sepsis auf Intensivstation durch invasive Pilzinfektionen verursacht. In der Regel sind es Patienten mit Stammzell-, Knochenmark- und Organtransplantationen und der damit verbundenen immunsuppressiven Therapie [100, 101]. Andere bekannte Risikofaktoren für die Entstehung einer invasiven Pilzinfektion sind Operationen, akutes Nierenversagen, parenterale Ernährung, Katheter sowie extensive Anwendung von Breitbandantibiotika und dem zunehmenden Alter der Gesamtbevölkerung [102]. Als Erreger der invasiven Mykosen sind 50-60 % Candidainfektionen und 30-40 % Aspergillosen von zentraler Bedeutung [103]. Aktuell nehmen die Aspergillusinfektionen kontinuierlich zu, während die Candidainfektionen abnehmen [104]. Die Letalität der betroffenen Patienten ist hoch. Nach wie vor ist die Diagnostik invasiver Pilzinfektionen schwierig, da eindeutige spezifische und hoch sensitive Testverfahren fehlen. Bei hämatologischen Patienten erfolgt die Anwendung prophylaktisch, sowie nach Organtransplantation. Jedoch stellt sich die Frage nach der Sicherheit der Medikamente für die Patienten in Bezug auf potentielle Arzneimittelreaktionen und Nebenwirkungen. Für die Therapie von Pilzinfektionen stehen vergleichsweise nur wenige Substanzen zur Verfügung, da wegen der Ähnlichkeit in Struktur und Stoffwechsel der Pilzzellen mit humanen Zellen bislang nur wenige spezifische Angriffspunkte nutzbar gemacht werden konnten. Durch die Entwicklung neuer Antimykotika (Abb. 2) mit geringeren Nebenwirkungen und gesteigerter therapeutischer Effektivität hat sich die Therapiemöglichkeit invasiver Mykosen verbessert [105].

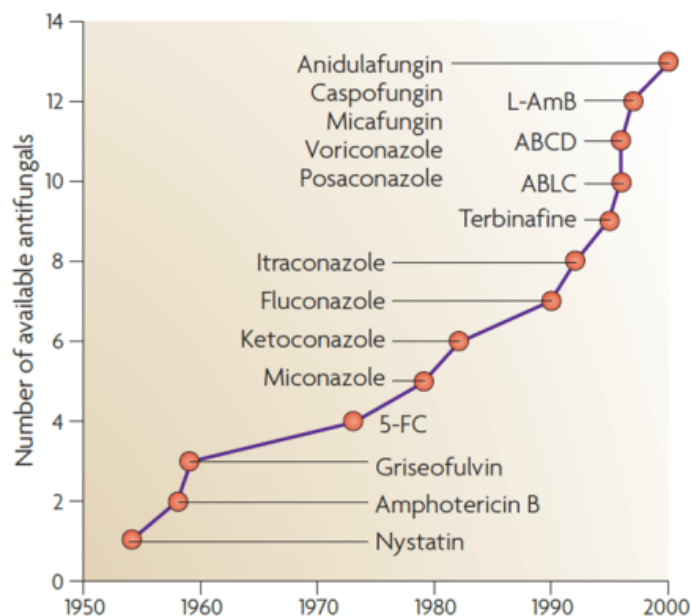


Abb. 2 Zeitleiste der systemischen Antimykotika [106]

Die Grafik zeigt den Namen, die Nummer (y-Achse) und die Geschwindigkeit der Entwicklung (x-Achse) von den verfügbar systemischen Antimykotika ab 1950 bis 2000.

ABCD-Amphotericin B kolloidalen Dispersion |

ABLC-Amphotericin B Lipid-Komplex |

5-FC-Flucytosin |

L-AmB-liposomales Amphotericin B

Die derzeit im klinischen Einsatz zugelassenen systemischen Antimykotika zur Prophylaxe oder Therapie können in folgende Substanzklassen eingeteilt werden: Polyene, Azole (Triazole, Imidazole), Allylamine, 5-Flucytosin und Echinocandine. Die größte Bedeutung in der Therapie von invasiven Candida- Infektionen besitzen die Polyene, die Triazole und die Echinocandine. (siehe Tab. 4)

Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Antimykotika mit ihren Eigenschaften [106–108]

Antimykotika Parameter	Liposomales Amphotericin B	Anidulafungin	Caspofungin	Fluconazol	Voriconazol
Wirkstoff-Gruppe	Polyene	Echinocandine		Triazole	
Wirk-mechanismus	irreversible Wirkstoffbindung an Ergosterol in der Zytoplasmamembran → Permeabilitätssteigerung der Pilzmembran → Porenbildung → Verlust von Proteinen Nukleotiden (Abb. 2 c)	Hemmung der Synthese von beta-(1,3)-D-Glukan, einem pilzspezifischen Enzym – (Hauptbestandteil der Pilzzellwand) → osmotische Instabilität der Zellwand (Abb. 2 a)		Hemmung der Ergosterol-Synthese in der Pilzmembran durch Hemmung der Lanosterol-14α-Demethylase → Mangel an Ergosterol verhindert den konkreten Aufbau der Pilzmembran (Abb. 2 b)	
Wirkung	Fungizid	Fungistatisch		fungistatisch	
Proteinbindung	84 %	99 %	97 %	12 %	58 %
Metabolisierung	keine Metabolisierung, Eliminierung mittels Phagozytose durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems + andere Prozesse	nicht hepatisch, spontane Degradation, unspezifische Peptidasen	hepatisch (CYP450), N-Acetylierung spontane Hydrolyse des	gering hepatisch, selektiver Inhibitor von CYP2C9,	hepatisch über Isoenzyme CYP2C19, -2C9, -3A4

			Hexapeptid-Ringes	-3A4 und -2C19	
Eliminierung	30-40 % Galle, Urin, Fäzes 85 %) und biliär ausgeschieden	Urin: < 1 % unverändert, 30 % Fäzes	Urin: 2 % unverändert, 40 % Metaboliten, 35 % Fäzes	Urin: 80 % unverändert	Urin: < 5% unverändert

Die Präparate unterscheiden sich bezüglich ihrer Wirkspektren, Wirkmechanismen (Abb. 2), der zugelassenen Indikationen, Nebenwirkungsspektren und potentiellen Arzneimittelreaktionen sowie im Preis [107]. Bezüglich der Wirkungsweise wird analog zu den Antibiotika zwischen fungizid (abtötend) und fungistatisch (vermehrungshemmend) unterschieden.

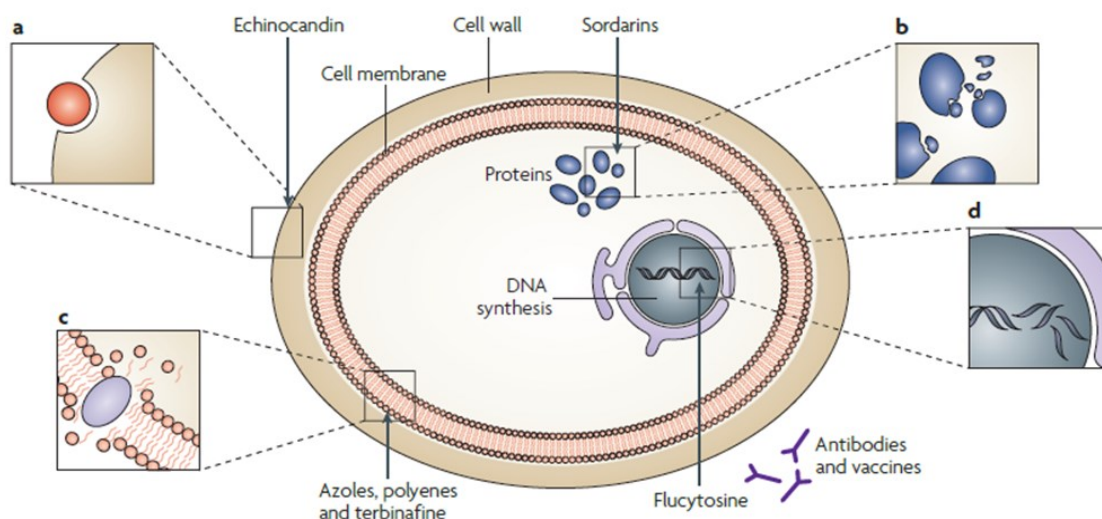


Abb. 2 Wirkmechanismen systemischer Antimykotika. Darstellung der Wirkmechanismen von derzeit verfügbaren Antimykotika sowie ausgewählte Fungiziden in der Entwicklung. **a**] Echinocandine und Nikkomycin Z hemmen die Bildung der Pilzzellwand **b**] Sordarins stören Proteinassamblierung **c**] Azole, Polyene und Tebinafin stören die Pilzzellmembran **d**] Flucytosin, ein fluoriertes Pyrimidin, stört die DNA-Synthese der Pilzzellen (Abb. 2d) Es wird in der Pilzzelle nach Aufnahme zu dem wirksamen Metaboliten 5-Fluorouracil reduziert, welches als Antimetabolit wirksam ist. Diese Umwandlung kann nur in der Pilzzelle, jedoch nicht in menschlichen Zellen stattfinden [106]

1.4.1 Polyene

1.4.1.1 Liposomales Amphotericin B (L-AmB)

Amphotericin B Desoxycholat als „klassische“ Formulierung (AmB) ist ein Polyenmakrolid aus dem Actinobacterium *Streptomyces nodosus* [109]. AmB, seit 1957 auf dem Markt, war über viele Jahre der Goldstandard der systemischen antimykotischen Therapie. Jedoch wird die breite Wirksamkeit durch die ausgesprochene geringe Löslichkeit und schlechte Verträglichkeit deutlich beeinträchtigt. Zudem ist AmB ein stark toxischer Arzneistoff, weshalb eine Dosislimitierung auf 3-5 g Gesamtdosis besteht [110]. Die Bindung von AmB an Cholesterin in der Zellmembran der menschlichen Zellen ist vermutlich die Ursache für den Großteil der unerwünschten Wirkungen,

wie die ausgeprägte Nephrotoxizität [111]. Durch die Einarbeitung von Arzneistoffen in Liposomen, konnten nachweislich auftretende Toxizitäten bei gleichem pharmakologischem Effekt reduziert werden [112, 113]. AmBisome® (L-AmB), die einzig echte liposomale AmB-Zubereitung neben AmB Lipidkomplex (ABLC, Abelcet®) und AmB Kolloiddispersion (ABCD, Amphocil®), wurde 1994 in Europa zugelassen. Derzeit wird L-AmB zur Therapie bei Patienten mit schweren invasiven Mykosen oder zur empirischen Behandlung von vermuteten Pilzinfektionen bei neutropenischen Patienten mit Fieber, bei denen konventionelles AmB auf Grund einer Leber- bzw. Nierenschädigung oder aus Unverträglichkeit kontraindiziert ist, angezeigt [114]. AmB ist in kleine echte Liposomen eingelagert, die aus Phosphatidylglycerol, Cholesterol und Distearylphosphatidylglycerin bestehen. Dabei beträgt das Arzneimittel-Lipid-Verhältnis 1:9. Das AmB gelangt in die Pilzzelle durch die Verschmelzung der Liposomen mit der Pilzzellmembran. Der Wirkmechanismus des AmB ist dabei nicht beeinträchtigt. Durch die Einbettung von AmB in die Liposomen ist eine höhere Dosierung möglich [115]. L-AmB besitzt höhere Plasmakonzentrationen als das konventionelle AmB und die anderen Lipidformulierungen. Jedoch wird L-AmB trotz einer langsamen Clearance überwiegend in der Leber gespeichert. Aufgrund des größeren Molekulargewichts von L-AmB ist die Penetrationsrate in die Nierenzellen minimal, so dass eine stark verminderte Nephrotoxizität als entscheidende Verbesserung gegenüber dem konventionellen AmB deutlich wurde. L-AmB wird häufig wegen des deutlich höheren Preises nur bei Notwendigkeit zum Abbruch der AmB-Behandlung, aufgrund starker Nebenwirkungen, eingesetzt [116–118]. Die ausgeprägten und oft schweren Nebenwirkungen wirken therapiebegrenzend. Grund dafür ist eine 1000-fach erhöhte Affinität von AmB für Ergosterol im Vergleich zu der für das Cholesterin der menschlichen Zelle [119, 120]. Dass lipidgebundene AmB ist pharmakologisch inaktiv und wird zum Entfalten der Wirkung aus dieser Bindung freigesetzt. Aufgrund dessen ist die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes am Infektionsort Grund für die verminderte Toxizität.

1.4.2 Echinocandine

1.4.2.1 Caspofungin

Caspofungin, ein zyklisches Hexapeptid mit einer Fettsäuren-Seitenkette, war der erste Vertreter der Echinocandine und ist seit 2002 unter dem Namen Cancidas® in Deutschland erhältlich [121]. Das semi-synthetische Lipopeptid ist das Derivat aus einem Fermentationsprodukt des Pilzes *Glarea lozoyensis* [122]. Caspofungin wirkt fungizid gegen *Candida*- und *Aspergillus Sp.* und gegen *Pneumocystis jirovecii*. Gegen *Kryptokokken* konnte keine Wirksamkeit festgestellt werden. Die Applikation erfolgt intravenös, da es bei oraler Gabe kaum biologisch verfügbar ist. Der bestimmende Faktor für die Abnahme der Plasmakonzentration ist die Verteilung im Gewebe. Die höchsten Organkonzentrationen wurden in der Leber, Lunge, Darm, Niere und Milz gemessen [123]. Aufgrund der nicht-linearen Kinetik verursacht eine Dosissteigerung einen leicht

überproportionalen Anstieg des Plasmaspiegels. Aufgrund dessen nimmt die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bei einer mittelschweren Leberinsuffizienz um 75 % zu, während eine Niereninsuffizienz die Plasmakonzentration nicht wesentlich verändert. Generell zeigt Caspofungin in klinischen Studien eine gute Verträglichkeit mit Inzidenzraten von UAW unter 3 % [124]. Caspofungin zeichnet sich durch hohe Effektivität und geringe Toxizität aus [125]. Hinweise zur Hepatotoxizität (< 5 %) sind wenig beschrieben [126–128].

1.4.2.2 Anidulafungin

Anidulafungin ein semisynthetisches Lipopeptid, das aus einem Fermentationsprodukt von *Aspergillus nidulans* synthetisiert wird [129], ist seit September 2007 unter dem Namen Ecalta® als zweites Echinocandine nach Caspofungin für die Behandlung von invasiven Candida-Infektionen bzw. der Candidämie zugelassen. Im Rahmen einer prospektiven randomisierten Studie konnte nachgewiesen werden, dass Anidulafungin bei invasiven Candida-Infektionen im Vergleich zu Fluconazol therapeutisch überlegen ist. Die klinische Erfolgsrate war sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der Subpopulation mit *C. albicans*-Infektionen signifikant höher als die mit Fluconazol-Behandelten [130]. Im Gegensatz zu anderen Echinocandinen besitzt Anidulafungin neben dem zyklischen Hexapeptid als Grundgerüst strukturelle Unterschiede in einigen Substituenten. Unter anderem trägt Anidulafungin eine Pentoxyoxy-Triphenyl-Seitenkette. Dadurch entstehen unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften, wie z.B. geringe Wasserlöslichkeit im Vergleich ist zu Caspofungin und Micafungin. Die Plasma-Pharmakokinetik ist dosislinear und zeigt eine geringe interindividuelle Variabilität bei Patienten unterschiedlichen Alters, Gewichts und Geschlechts [131]. Die Eliminationshalbwertszeit ist mit etwa 24 h deutlich länger als bei anderen Echinocandinen [132]. Die Plasma-Eiweiß-Bindung ist mit 99 % sehr hoch, weshalb eine gute Penetration in das Zentrale Nervensystem (ZNS) nicht zu erwarten ist. Anidulafungin wird nicht hepatisch metabolisiert, aufgrund dessen weist der Wirkstoff keine relevanten Arzneimittelinteraktionen auf und erfordert keine Dosisanpassungen bei speziellen Patientengruppen (z.B. bei Niereninsuffizienz oder Leberinsuffizienz). Anidulafungin zeigt keinerlei dosislimitierende Toxizität [133]. Obwohl klinisch manifeste Hepatotoxizität in Einzelfällen aufgetreten ist, wurde kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen [134].

1.4.3 **Azole**

Die größte Gruppe der Antimykotika stellen die Azole dar. Man unterscheidet in die Gruppen der Triazole (Behandlung von systemischen Infektionen) und die Gruppen der Imidazole (lokale Anwendungen). Azole sind Breitbandantimykotika, die fungistatisch und in hohen Dosen fungizid wirken.

1.4.3.1 Fluconazol

Fluconazol (Beispiel Diflucan®), ein fluoriertes Triazol-Derivat, war das erste Azol-Antimykotikum, das ein erheblich reduziertes Nebenwirkungsspektrum im Vergleich zu seinen Vorgängersubstanzen aufwies. Fluconazol ist für ein breites Spektrum von lokalen und systemischen Pilzinfektionen bei Erwachsenen und Kindern zugelassen. Die Wirksamkeit gegen Schimmelpilze ist gering [135, 136]. Aufgrund dieses Wirkspektrums, seiner guten Verträglichkeit und hohen Bioverfügbarkeit mit relativ vorhersehbaren Serumspiegeln nach oraler oder parenteraler Gabe wird Fluconazol sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe von Hefepilzinfektionen breit eingesetzt. Fluconazol kann oral und parenteral angewendet werden. Beim Wechsel von intravenöser zu peroraler Gabe und umgekehrt ist keine Änderung der Tagesdosis erforderlich [137]. Zu den Nebenwirkungen gehören vor allem gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Sehstörungen und in seltenen Fällen Leberschäden (<0,1 %) [138]. Wie auch die anderen Azol-Präparate wird Fluconazol überwiegend hepatisch verstoffwechselt und besitzt ein hepatotoxisches Potenzial [139]. Die Ursache der klinisch manifesten Hepatotoxizität von Fluconazol ist unbekannt. Allerdings kann es sich auf die Fähigkeit von Fluconazol die Sterolsynthese zu verändern, beziehen. Fluconazol ist ein potenter Inhibitor der CYP450-Enzyme und kann aufgrund dessen zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-spiegel und Toxizität von Medikamenten, die normalerweise durch CYP3A4 metabolisiert werden, insbesondere Statine und Cyclosporin führen. Eine Fluconazol-bedingte Hepatotoxizität ist beim Absetzen der Therapie gewöhnlich reversibel [140, 141].

1.4.3.2 Voriconazol

Voriconazol (Vfend®) ist ein synthetisch hergestelltes Triazol-Derivat mit breitem Wirkungsspektrum, das strukturelle Verwandtschaft zu Fluconazol aufweist. Voriconazol ist seit 2002 unter dem Handelsnamen Vfend® zur Therapie von Mykosen zugelassen. Es verfügt über ein breites antimykotisches Wirkspektrum, das bei den meisten klinisch relevanten Hefen und Schimmelpilzen (außer Zygomyceten) eingesetzt wird [122]. Unter anderem auch bei Spezies bzw. Isolate, die gegen Fluconazol bzw. AmB resistent sind. Voriconazol kann peroral und parenteral angewendet werden, wirkt fungizid und steht in drei Darreichungsformen zur Verfügung. Eine flexible Umstellung der Darreichungsformen ist aufgrund der Bioäquivalenz möglich. Es wird nach oraler Gabe rasch und vollständig resorbiert. Weil es relativ gut, aufgrund der geringen Molekülgröße (349 Da), ins ZNS penetriert, können auch zerebrale Schimmelpilzinfektionen damit behandelt werden [142–144]. Deshalb kann Voriconazol auch bei *Aspergillosen* im ZNS eingesetzt werden, was vor allem Patienten auf Intensivstationen zu Gute kommt, da diese maßgeblich an der hohen Mortalitätsrate von ITS-Patienten beteiligt sind. Voriconazol hat sich in Therapiestudien und in klinischen Anwendungen als gut verträgliche Substanz erwiesen. Allerdings zeigt Voriconazol wegen der hepatischen Metabolisierung wie andere Azolantimykotika eine Reihe CYP450-

vermittelter pharmakokinetischer Interaktionen. Voriconazol zeigt einen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasmaspiegel und einer erhöhten Rate an Nebenwirkung, insbesondere Nephrotoxizität [145]. Zudem gehören zu den häufigsten Nebenwirkungen reversible Leberfunktionsstörungen [146], sowie transiente Sehstörungen (Farberkennung) [122]. Klinisch manifeste Hepatotoxizität ist selten, kann aber häufiger als bei der Behandlung mit Fluconazol und Itraconazol sein. Jedoch ist die Ursache nicht bekannt. Es kann jedoch eine gewisse Korrelation der Fähigkeit von Voriconazol die menschliche Sterol-synthese zu verändern, begründet sein. Da Voriconazol ein Substrat für mehrere P450-Enzyme (CYP2C19, -2C9, -3A4) ist, hat es das toxische Potenzial, signifikante Arzneimittelinteraktionen, einschließlich Erhöhungen der Plasmaspiegel von anderen Medikamenten, die über diese P450 Enzyme metabolisiert werden, zu verursachen [147–149].

Wie in diesem Kapitel dargelegt, sind Antimykotika einerseits häufig verwendete Substanzen bei kritisch kranken Patienten. Auf der anderen Seite ist das hepatotoxische Potenzial wenig untersucht. Dies soll in einem Teil dieser Promotion durch einen in-vitro-Test erfolgen.

2 ZIELSTELLUNG

Als Grundlage dieser Promotion wurde ein zelluläres Modellsystem basierend auf der humanen Hepatomzelllinie HepG2/C3A gewählt. Der Zytotoxizitätstest (Biosensor) wurde als Diagnostikum zur Früherkennung eines Leberversagens patentrechtlich geschützt.

Die Zielstellung der Promotion soll die Standardisierung des Hepatotoxizitätsassays unter Verwendung einer Master- und Workingzellbank zur Verwendung für Medikamententestung sein.

Zur Validierung der Messergebnisse sollen Vergleichsversuche (Zellvitalität, Fremdstoff-metabolismus) mit humanen primär isolierten Hepatozyten durchgeführt werden. Dies soll der vergleichenden Beurteilung potentieller Übereinstimmungen der Hepatotoxizität dienen. Weiterhin soll Paracetamol als Positivkontrolle für den Hepatotoxizitäts-Assay etabliert werden. Paracetamol wird als Modellarzneistoff verwendet, da dieser mit seltenen aber schwerwiegenden Fällen idiosynkratischer Leberschädigung in Verbindung gebracht wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit soll die Etablierung von Apoptose-Assays (DNA-Fragmentierung und CD95-Expression) zur Parametererweiterung des Hepatotoxizitäts-Assays sein, um möglichst früh Auskunft über die gegebenenfalls auftretende Lebertoxizität zu bekommen.

Der Schwerpunkt dieser Promotion soll auf der Untersuchung der Substanzwirkung von ausgewählten intensivmedizinisch-relevanten Antimykotika als Arzneimittelzubereitungen:

- Liposomales Amphotericin B
- Anidulafungin
- Caspofungin
- Fluconazol
- Voriconazol

auf die Hepatozyten in Hinblick auf deren hepatotoxisches Potential liegen. Dieses wird mit dem Standard-Mikrotiterplatten-Assay bestimmt. Dabei soll der Fokus auf generelle Zell-schädigung und Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus liegen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Testsubstanzen

3.1.1 Antimykotika

Die in Tab. 5 aufgeführten Substanzen wurden zur Überprüfung der Zytotoxizität in den Tests verwendet. Da viele der Substanzen nicht als Reinsubstanz verfügbar sind, wurden die handelsüblichen Medikamentenzubereitungen für alle Testreihen genutzt.

Tab. 5 Übersicht der verwendeten Antimykotika

Eigenschaft	Antimykotika	Anidulafungin	Liposomales Amphotericin B	Caspofungin	Fluconazol	Voriconazol
Handelsname		Ecalta®	AmBisome®	CANCIDAS®	Fluconazol-ratiopharm	Vfend®
Arzneiform		100 mg Pulver	50 mg Pulver	50 mg Pulver	2 mg/ml Infusionslösung	200 mg Pulver
Hersteller		Pfizer	GILEAD	MSD	Ratiopharm	Pfizer
Stammlösung (SL)		30 ml steriles Wasser zum Auflösen	12 ml steriles Wasser zum Auflösen	10,5 ml steriles Wasser zum Auflösen	200 mg/100 ml	19 ml steriles Wasser zum Auflösen
Konzentration		3,33 mg/ml	4 mg/ml	5 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml
pH-Wert (in Lösung)		7,06	6,47	7,26	7,24	7,29
Arbeitslösung (AL)		7,75 ml 0,9 % NaCl 2,25 ml SL	4 ml 5 % Glucose 4 ml SL	49 ml 0,9 % NaCl 1 ml SL	5,5 ml 0,9 % NaCl 4,5 ml SL	9,75 ml 0,9 % NaCl 0,25 ml SL
Konzentration		0,75 mg/ml	2 mg/ml	0,1 mg/ml	0,9 mg/ml	0,25 mg/ml
pH-Wert (in Lösung)		7,20	6,62	7,30	7,27	7,29
Lagerung		bis 24 h bei RT	bis 24 h bei RT 7 d bei 2-8 °C	bis 24 h bei RT bis 48 h bei 2-8 °C	bis 24 h bei 2-8 °C	bis 24 h bei 2-8 °C
verwendete Konzentration (C_{max})		2,25 mM ^[150, 151]	5,725 mM ^[152, 153]	0,2 mM ^[154, 155]	4,5 mM ^[156]	0,25 mM ^[157, 158]
5-fache Konzentration		11,25 mM	28,625 mM	1,0 mM	22,5 mM	1,25 mM
10-fache Konzentration		22,50 mM	57,250 mM	2,0 mM	45,0 mM	2,50 mM

RT: Raumtemperatur; Quelle für C_{max} Konzentration

3.1.2 Paracetamol

Zur Herstellung der 800 mM Stammlösung wurden 6,05 g des Wirkstoffes Acetaminophen (MW= 151,6 g/mol) in 50 ml Ethanol (absolut) gelöst. Nach vollständigem Lösen des weißen Pulvers mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die Lösung (pH-Wert=7,30) sterilfiltriert und bei Raumtemperatur für max. 6 Monate gelagert. Aus dieser Stammlösung wurde für jeden Versuchsansatz die Arbeitslösung frisch hergestellt. Dabei wurde die Stammlösung mit Kulturmedium (pH-Wert=7,60) oder mit Plasma (pH-Wert=7,53) um Faktor 5,25 verdünnt, um eine Konzentration von 152,4 mM zu erhalten. In den Versuchsreihen wurden die Konzentration 1,52 mM, 7,62 mM und 15,24 mM getestet.

3.2 Allgemeine Zellkultur

Für den auf humanen Hepatozyten basierenden Zytotoxizitätstest wurde die humane Zelllinie HepG2/C3A verwendet. Dabei handelt es sich um den Subklon der Hepatoblastom Zelllinie HepG2. Die HepG2-Zellen wurden 1975 von Aden et al. aus dem hepatozellulären Karzinom eines 15-Jährigen argentinischen Jungen isoliert. Die Zellen werden häufig für toxikologische Fragestellungen eingesetzt und sind hinsichtlich vieler phäno- und genotypischer Eigenschaften gut charakterisiert [159, 160] Im Anhang sind die verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte in Tab. 18, 19 und 20 aufgeführt.

3.2.1 Morphologie

Die morphologische Gestalt der HepG2/C3A ist mit dem flachen, polygonalen Erscheinungsbild und einer Größe von 12-19 µm charakteristisch für Leberparenchym-zellen. Die adhärennten Zellen wachsen größtenteils als Monolayer in kleinen Aggregaten [161]. Im Zellrasen zeigen die Zellen epitheloides Wachstum, das am Rand unregelmäßiger und aufgebläht erscheint. Die Zellen, die sich vom Zellverband gelöst haben, wachsen gelegentlich auch fibroblastenartig. Bei längeren Kultivierungszeiten kommt es zu einem dreidimensionalen Wachstum, wobei die interzellulären Verbindungen sehr intensiv sind, so dass eine Ablösung mit Trypsin erschwert wird. Die Morphologie der HepG2/C3A ist denen von humanen Hepatozyten in Kultur sehr ähnlich, lediglich der Nukleus ist mit 8-12 µm im Gegensatz zu Hepatozyten von Mensch oder Ratte sehr groß [162].

3.2.2 Kultivierung

Die HepG2/C3A-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 60 % Luftfeuchtigkeit im Brut-schrank kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % oder 15 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamin-Lösung (200 mM) und 1 % Antibiotika- / Antimykotika-Lösung (Penicillin G (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)). Zur Revitalisierung wurden die Hepatozyten in das beschriebene Kulturmedium über-führt und nach

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip) in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml und einer Vitalität $> 70\%$ in eine 25 T Zellkulturflasche (10 ml Volumen) eingesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, danach im Rhythmus Montag – Mittwoch – Freitag. Wurde eine Konfluenz von etwa 80 – 90 % erreicht, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, der Monolayer mehrmals mit Phosphate buffered Saline (PBS) gespült und die Zellen anschließend durch Zugabe von 2 ml Trypsin EDTA (1,25 mg/ml) abgelöst. Abschließend wurden die Zellen nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (Vitalität $> 90\%$) je nach Verwendungszweck in Zellkultur-Flaschen oder Multi-wellplatten ausgesät. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. In den folgenden beschriebenen Experimenten haben die verwendeten Zellen die Passage 10 nicht überschritten.

3.2.3 Master- und Workingzellbank

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Masterzellbank der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2/C3A unter Good Laboratory Practice-Bedingung (GLP) erstellt. Ein Vial von der American Type Culture Collection (ATCC CRL-10741) mit 1×10^7 Zellen/ml wurden ausgesät und innerhalb von 23 Tagen soweit kultiviert, dass 140 Kryoröhrchen mit 1×10^7 Zellen/ 2 ml kryokonserviert und im Stickstoff eingelagert werden konnten.

Für die Überprüfung der gewonnenen Zellen wurden unterschiedliche Parameter analysiert. Die Beschreibung der Zellmorphologie erfolgte mittels Lichtmikroskopie, sowie mit Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie am Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) der Universität Rostock.

Zur molekulargenetischen Charakterisierung der Zellen wurde durch die Firma DIAGENOM GmbH (Molekulare und zytogentischer Diagnostik, Rostock) eine Short-Tandem-Repeat (STR)-Markeranalyse durchgeführt. Die Zellen der hergestellten Masterzellbank (ATCC) wurden mit den bisher genutzten HepG2/C3A-Zellen verglichen. Dabei fand eine Fragment-längenanalyse von 11 STR-Markern zur Gegenüberstellung der Zelllinien statt. Neben den früheren charakteristischen Markern Amelogenin, CSF1PO, D13S317, D13S539, D16S539, D5S818, D7S820, THO1, TPOX, vWA wurden noch zwei weiteren, im Primergemisch enthaltene Bereiche (D3S1358 und D21S11) untersucht.

Die Kontaminationsüberprüfung der Zellkulturüberstände auf Mycoplasmen wurde mittels MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bei dem Test wird die Aktivität mycoplasmatischer Enzyme ausgenutzt, die die Umwandlung von ADP in ATP unter Bildung eines Farbumschlages bewirken, der im Luminometer nachgewiesen werden kann. Zudem wurden Zellkulturüberstände mikrobiologisch durch das Medizinische Labor Rostock auf Bakterien, Pilze und Viren untersucht. Zur quantitativen Überprüfung der Viruslast wurden die Zellkulturüberstände auf ausgewählte Viren getestet. Mit Hilfe eines Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase

Chain Reaction, PCR) wurde durch Vervielfältigung des Erbmaterials der Erreger von CMV (Cytomegalie-Virus), EBV (Epstein-Barr-Virus) und HBV-DNA (Hepatitis-B-Virus) als direkter Virusnachweis bestimmt. Der quantitative Nachweis von HCV-RNA (Hepatitis-C-Virus) wurde mittels one-step-real-time PCR mit sequenzspezifischen Primern und Detektion über Fluoreszenzmessung nach Hybridisierung von sequenzspezifischen, fluoro-genen Sonden (Cobas TaqMan-Prinzip) durchgeführt. Des Weiteren wurde die HIV-1-RNA-Viruslastbestimmung (Humane Immundefizienz-Virus) im Zellkulturüberstand durch PCR bestimmt. Zur Überprüfung der Funktionalität der Masterbank-Zellen wurden folgende Tests (Testbeschreibung siehe 3.6) durchgeführt:

- Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels XTT
- Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH)
- Bestimmung Zellzahl und Vitalität
- Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin
- Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2

Nach Charakterisierung der Zellen konnte eine Workingzellbank aus 2 Kryoröhrchen der Masterzellbank generiert werden. Nach 20-tägiger Kultivierung der Zellen konnten 20 Kryoröhrchen mit 1×10^7 Zellen/ml hergestellt und kryokonserviert werden. Diese Zellen wurden nach Funktionalitätsüberprüfung für die Testung der Hepatotoxizität verwendet.

3.3 Hepatotoxizität

Einheitliche Standards haben sich für die Evaluierung von in-vitro Hepatotoxizität mit Hepatozyten noch nicht herausgebildet. Um eine möglichst umfassende Aussage treffen zu können, ist der Einsatz von mehreren Tests, die die systematischen Kategorien der Zellvitalität und -funktion abdecken, erforderlich.

3.3.1 Herstellung eines Plasmapools

Aufgrund der unterschiedlichen Plasmaeiweißbindung der zu testenden Medikamente ist es notwendig ein für alle diese Substanzen gleichartiges Plasma zu verwenden. Dazu wurde von freiwilligen gesunden Vollblutspendern ohne Medikation Blut gewonnen. Die Antikoagulation erfolgte durch 50 IE Heparin/ml Blut. Nach zwei stündiger Ruhezeit wurde das antikoagulierte Heparin-Blut zentrifugiert (5000 g, 7 min, 4 °C, ohne Bremse). Das dadurch gewonnene Frischplasma wurde mit einem manuellen Plasmaextraktor separiert und im Anschluss gepoolt. Heparin-Plasma ist zellfrei (Erythrozyten, Leukozyten) kann aber noch Spuren von Zellanteilen (Thrombozyten) enthalten. Zur Lagerung in 50 ml Blue Caps bei -30 °C wurde das Plasma abschließend über eine Sterilfiltereinheit mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert.

3.3.2 Testvorbereitung

Zur Testung der Grundparameter (siehe Tab. 7) wurden pro zu testende Substanz drei 24-Well-Platten mit in DMEM-Medium kultivierten Zellen verwendet. Zur Aktivitätsbestimmung von CYP1A2 (siehe Abschnitt 3.6.3.1) wurden die Hepatozyten mit 15 % FKS-haltigem DMEM-Medium kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 3-Methylcholanthren (3-MC) in einer Konzentration von 2,68 mg/l (10 μ m) vom 14. bis zum 21. Tag nach der Revitalisierung vorstimuliert. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie 3-MC, induzieren vor allem CYP Isoenzyme der Familie 1. HepG2/C3A zeigen eine geringe CYP1A2 Enzymaktivität. Dieses Enzym besitzt vor allem für den Arzneistoffmetabolismus in der Leber eine wichtige Funktion. Durch die Induktion mit 3-MC kann eine Aktivitätssteigerung über das 40-fache im Vergleich zum Ausgangswert erreicht werden [163]. Bei der Aussaat der vorstimulierten Zellen in die 24-Well-Platte 3 wurde zur Aufrechterhaltung und weiteren Steigerung der Enzymaktivität dem Kulturmedium eine erhöhte 3-MC Konzentration von 5,36 mg/l (20 μ m) hinzugefügt. Die Kultivierung der HepG2/C3A für die 24-Well Platte 1 und 2 erfolgte mit 10 % FKS-haltigem Kulturmedium. Die Zellen wurden 3 Wochen so kultiviert, dass am geplanten Versuchstag eine Konfluenz von etwa 100 % erreicht wurde. Am Vortag der Experimente wurde außerdem ein Mediumwechsel durchgeführt, so dass sich die Zellen zum Versuchszeitpunkt unter gleichen Bedingungen befunden haben.

3.3.3 Testdurchführung

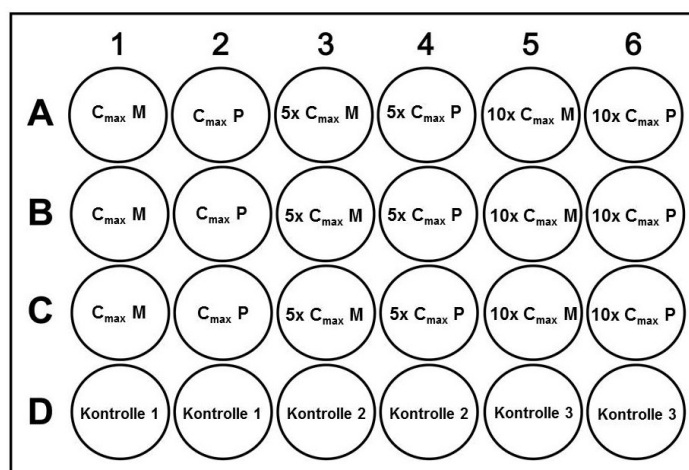


Abb. 3 Belegung einer 24-Well-Platte, **M** - DMEM + 10 oder 15 % FKS | **P** - eigenhergestelltes Gesundheitsplasma

Bei allen drei 24-Well-Platten wurde folgendes Schema (siehe Abb. 3) pipettiert. Pro 24-Well-Platte wurden drei unterschiedliche Konzentrationen pro Testsubstanz pipettiert. Dabei war C_{\max} die niedrigste Konzentration, die sich im klinischen Einsatz befindet, Anwendung fand weiterhin die 5-fache und 10-fache Konzentration von C_{\max} .

Bedingt durch die unterschiedliche Plasmaproteinbindung der verwendeten Medikamente wurden neben dem oben beschriebenen Kulturmedium sämtliche Medikamentenansätze auch in 100 % selbst hergestelltem Gesundheitsplasma getestet. Zusätzlich zu den drei Konzentrationen in dreifacher Ausführung wurden drei unterschiedliche Kontrollen jeweils im Doppelansatz auf die 24-Well-Platte aufgetragen. Bei Kontrolle 1 handelt es sich um DMEM-Medium, welches

entweder mit 10 oder 15 % FKS entsprechend der Aufgabenstellung versetzt wurde. Die Kontrolle 2, DMEM-Medium, wurde nicht mit FKS versetzt, so dass Rückschlüsse auf den Einfluss von FKS gezogen werden können. Das selbst hergestellte Gesundplasma fungierte als dritte Kontrolle.

Der weitere detaillierte Testablauf des Hepatotoxizitäts-Assay für die drei 24-Well-Platten wird in der Tab. 6 beschrieben.

Tab. 6 Beschreibung des siebentägigen Testablaufes

Ansatz Tag	24-WELL-PLATTE 1	24-WELL-PLATTE 2	24-WELL-PLATTE 3
	<u>HepG2/C3A</u> mit 10 % Kulturmedium	<u>HepG2/C3A</u> mit 10 % Kulturmedium	<u>HepG2/C3A* (3-MC stimuliert)</u> mit 15 % Kulturmedium
1	Aussaat der Zellen 500.000 Zellen in 250 µl/Well → 2,0 x 10 ⁶ /ml - nach 4 h Adhärenz (Inkubation unter Standardbedingung) → Zugabe der Testsubstanzen (1ml)	Aussaat der Zellen 500.000 Zellen in 250 µl/Well → 2,0 x 10 ⁶ /ml - nach 4 h Adhärenz (Inkubation unter Standardbedingung) → Zugabe der Testsubstanzen (1ml)	Aussaat der 3-MC stimulierten Zellen 500.000 Zellen in 500 µl/Well → 1,0 x 10 ⁶ /ml
2 / 3	- Inkubation unter Standardbedingung	- Inkubation unter Standardbedingung	täglich Mediumwechsel - Medium absaugen - Zugabe von 500 µl 15 % Kulturmedium mit 3-MC (5,36 mg/l = 20 µm)
4	- Überstandsabnahme zur LDH-Bestimmung (3 d) - 2 x mit 1 ml PBS spülen - Zugabe der Testsubstanz (1ml)	- Überstand absaugen - 2 x mit 1 ml PBS spülen - Zugabe der Testsubstanz (1 ml)	- Überstand absaugen - 2 x mit 1ml PBS spülen - Zugabe der Testsubstanz (1 ml)
5 / 6	- Inkubation unter Standardbedingung	- Inkubation unter Standardbedingung	- Inkubation unter Standardbedingung
7	- LDH-Bestimmung (6 d) - Live/Dead (nach Bedarf) - Mikroalbumin - XTT-Test (indirekt)	- Zellzahl / Vitalität - XTT-Test (direkt)	- Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP1A2

LDH - Lactat-Dehydrogenase / 3-MC - 3-Methylcholanthren, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

3.4 Parameter des Hepatotoxizitätstest

3.4.1 Bestimmung von Vitalität und Proliferation

3.4.1.1 Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellvitalität

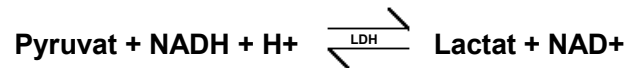
Der Standard zur Überprüfung der Vitalität ist die Anfärbung mit dem organischen Azofarbstoff Trypanblau, dessen Anion an Zellproteine bindet [164]. Die Trypanblau-Methode ist eine Ausschlussfärbung und ermöglicht eine Aussage über die Aufrechterhaltung des negativen inneren Plasmamembranpotenzials. Durch die negative Ladung von Trypanblau kann der Farbstoff nur in die Zellen penetrieren, bei denen das aktiv aufrechterhaltene innere Membranpotenzial zusammengebrochen ist. Dementsprechend gelangt der Farbstoff ausschließlich in toten Zellen durch die defekte Zellmembran. Dort bindet Trypanblau im Zytosol an Proteine und färbt die toten Zellen tiefblau. Zellmembranen von lebenden Zellen lassen den Farbstoff nicht penetrieren und bleiben demzufolge ungefärbt. Aufgrund seiner Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) kann der Farbstoff die intakte Membran nicht passieren [165]. Da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist, muss die Bestimmung unmittelbar nach Farbstoffzugabe durchgeführt werden [166].

Zu Beginn des Tests wurde der Überstand der Zellen pro Well in ein entsprechendes BlueCap überführt. Nachdem Waschen der Zellen mit PBS wurden die adhären Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Trypsin-Lösung inkubiert (37°C , $5\% \text{ CO}_2$, $60\% \text{ Luftfeuchtigkeit}$, 10 min). Die abgelösten Zellen wurden in das dazugehörige BlueCap überführt. Nach der Zentrifugation (5 min , 153 g) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Zellkulturmedium resuspendiert. Die mit Trypanblau und PBS verdünnte Zellsuspension (Bsp. 1:8 Verdünnung: $100 \mu\text{l}$ Trypanblau + $25 \mu\text{l}$ Zellsuspension + $75 \mu\text{l}$ PBS) wurde in die Zählkammer (C-Chip) pipettiert. Die lebenden und toten Zellen wurden innerhalb der vier Groß-Quadrate unter einem Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt. Der Mittelwert der lebenden Zellen multipliziert mit dem Faktor 10^4 und der entsprechenden Verdünnung ergeben die Lebendzellzahl/ml. Die Gesamtzellzahl/ml ergibt sich aus der Lebendzellzahl/ml multipliziert mit dem Volumen der Zellsuspension. Die Vitalität [%] der Zellen berechnet sich aus dem Quotienten von Lebend-zellzahl und Gesamtzellzahl (lebende + tote Zellen). In der Auswertung wurde die Lebendzell-zahl angegeben.

3.4.1.2 Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die Messung der LDH-Aktivität wird nicht nur zur Überprüfung der Vitalität von Zellen eingesetzt, sondern gilt auch als ein etablierter Endpunkt für die Bestimmung der Zytotoxizität von Testsubstanzen. Deren toxische Wirkung schädigt die Zellen unspezifisch und kann zur Freisetzung des zytosolischen Enzyms LDH durch den möglichen Verlust der Zellmembranintegrität kommen. Dies führt zu einer Akkumulation von LDH im Medium [167]. LDH ist ein hochmolekulares, intrazelluläres in allen Zellen vorkommendes Enzym (etwa 140 kDa), dass eine große Bedeutung für den Intermediärstoffwechsel der Zellen besitzt, da das Enzym bei der

Glykolyse mitwirkt. Es katalysiert je nach pH-Wert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat (und umgekehrt), dabei dient NADH (bzw. NAD) als Coenzym.



In vitalen Zellen befindet sich LDH im Zytoplasma. Bei einer Schädigung der Zellen geht die Integrität der Membran verloren. Infolgedessen wird die Membran für große Moleküle permeabel, LDH wird extrazellulär freigesetzt und kann außerhalb der Zelle gemessen werden. Eine geringe Hintergrundaktivität befindet sich jedoch auch stets in den Kulturüberständen von intakten Zellen [168].

Am Tag 3 und am Testtag wurden 200 µl Zellkulturüberstand pro Well der 24-Well-Platte in Mikrotubes pipettiert. Die LDH-Bestimmung erfolgte methodisch als kinetisch-optischer Test nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) [169]. Die Bestimmungen wurden am EDV-gestützten Analysenautomaten Cobas Mira spektralphotometrisch bei 340 nm durchgeführt, wobei der Verbrauch des Coenzym NADH + H⁺ als Maß für die LDH-Aktivität gilt.

3.4.1.3 Live/Dead Färbung

Das Live/Dead-Assay Kit dient zur fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Zellvitalität durch die Identifizierung lebender und toter Zellen. Die Methode basiert auf den Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe Calcein AM und Ethidium Homodimer-1. Diese unterscheiden sich nicht nur in den unterschiedlichen Wellenlängen (Farben), in denen sie fluoreszieren, sondern auch in den osmotischen Eigenschaften, wobei zwei charakteristische Vitalitätsparameter der Proben bestimmt werden: (1) die intrazelluläre Esteraseaktivität und (2) die Plasmamembranintegrität [170, 171].

Das nicht-fluoreszierende zellwandpermeable Esterasesubstrat Calcein-AM diffundiert durch die Zellmembranen und wird im Zytoplasma enzymatisch zu fluoreszierendem Calcein hydroxyliert (Abspaltung des Acetoxymethyl-Esterrests). Dieses bildet mit Calciumionen Chelate, welche die Zelle nicht verlassen können: das stark fluoreszierende Calcein (530 nm). Die Esteraseaktivität findet nur in vitalen Zellen statt, so dass die lebende Zelle durch gleichmäßige grünliche Fluoreszenz im Zytoplasma erkennbar ist. Der hydrophile rotfluoreszierende Farbstoff Ethidium Homodimer-1 kann nur durch die geschädigte Membran toter Zellen eindringen und bindet dort an Nucleinsäuren des Zellkerns. Dabei erfolgt eine vierzigfache Verstärkung der intensiv roten Eigenfluoreszenz (>600 nm). Intakte Membranen lebender Zellen kann Ethidium Homodimer-1 nicht durchdringen. Aus dem Verhältnis von lebenden und toten Zellen kann z.B. die Zytotoxizität von bestimmten Materialien ermittelt werden [172, 173].

Am Testtag wurde der Zellkulturüberstand der Wells abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl Live/Dead Reagenz (Calcein-AM

2 μM , Ethidium Homodimer-1 4 μM) pro Well. Nach einer Inkubation von 20 min bei Standardbedingung im Brutschrank konnten die entsprechenden Fluoreszenzen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den Filtern: GFP (457-487 nm) und Texas Red (542-582 nm) qualitativ beurteilt und fotografisch dokumentiert werden.

3.4.1.4 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie kann das Innere oder die Oberfläche von Proben durch Elektronen darstellen. Aufgrund der geringen Wellenlänge des Elektronenstrahls können im Gegensatz zur Lichtmikroskopie Vergrößerungen von mehr als 100.000-fach erreicht werden, da die Auflösung eines Lichtmikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist. Grundsätzlich werden zwei elektronenmikroskopische Verfahren unterschieden: Trans-missions- und Rasterelektronenmikroskopie [174].

Zur Probenvorbereitung wurden HepG2/C3A (100.000 Zellen/pro Well) auf ausgestanzten Melinex-Folien in 24-Well-Platten ausgesät. Nach drei Tagen Kultivierung mit den Testsubstanzen wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gespült und für mindestens zwei Stunden in Glutaraldehyd (4 % gepuffert in 0,1 M Natriumphosphatpuffer) fixiert.

Die Durchstrahlungs- oder Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die hochaufgelöste Abbildung von Zellmorphologien bis in den Sub-Nanometerbereich. Es können alle Strukturen der Zellen in ein zweidimensionales Bild projiziert werden, die genügend Kontrast erzeugen (durch Adsorption und/ oder Streuung von Elektronen) [175, 176]. Für die TEM-Aufnahmen wurden die fixierten Zellen in Puffer gewaschen und in 1 % gepufferten Osmiumtetroxid nachfixiert. Nach mehrfachen Spülen im Puffer erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe von 30-100 %, sowie die Anpassung an das Einbettungsmittel. Anschließend wurde die Polymerisation bei 58 °C im Brutschrank für zwei bis drei Tage durchgeführt. Die Ultradünnschnitt-Präparate (70-100 nm) wurden am Ultramikrotom hergestellt und in einer Lösung mit Toluidinblau, Borax und Pyronin gefärbt. Zur TEM-Aufnahme wurde innerhalb des Transmissions-Elektronenmikroskopes EM902 ein Vakuum erzeugt, um einen zielgerichteten Elektronenstrahl zu gewährleisten, der das Präparat durchstrahlt. Die Elektroden werden von einer Kathode erzeugt und mit einer Hochspannung beschleunigt. Durch die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Präparat entstehen verschiedene Signale, die mit einem Detektor aufgenommen werden und elektronisch zu einem Bild verarbeitet werden können [177].

Während im TEM nur Schnitte von Zellen betrachtet werden können, eignet sich die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) zur detaillierten Darstellung von Oberflächen. REM ermöglicht mikroskopische Abbildungen von Oberflächenflächenstrukturen mit höchster Auflösung und großer Schärfentiefe in vielfach hoher Vergrößerung [178]. Die fixierten Zellen wurden durch Kritische-Punkt-Trocknung (CPD) getrocknet. Zur Herstellung der Leitfähigkeit wurden die

Proben im Vakuum mit Hilfe eines Sputer-Coasters mit Gold, Chrom oder Nickel bedampft. Anschließend wurden die Präparate mit einem punktförmigen Raster abgerastert. Die rückgestrahlten primären oder sekundären Elektronen wurden mit einem geeigneten Detektor am Raster-Elektronenmikroskop DSM 960 A. aufgezeichnet [179, 180]. Die elektronen-mikroskopischen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem EMZ der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter der Leitung von Herrn PD. Dr. sc. nat. M. Frank mit Frau U. Schulz durchgeführt.

3.4.1.5 Live Cell Imager

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konfluenz, Wachstumskurven und Zeitrafferaufnahmen der Hepatozyten nach Aussaat in die 24-Well-Platten, sowie nach Zugabe der Test-substanzen (siehe 3.5, Tab. 9) aufgenommen. Der JuLI™ Br, ein digitaler „Live Cell Imager“, kann Echtzeitanalysen von Zellen unter Brutschrank-Bedingungen aufnehmen. Mit der Hellfeld-Mikroskop-Einheit (40-fach Vergrößerung), der LED-Lichtquelle und einer hochauflösenden Digitalkamera ist es möglich Zeitrafferaufnahmen, automatische Analysen der Zellkonfluenz und Aufnahmen von Wachstumskurven in Echtzeit zu erstellen.

3.4.2 **Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin**

Albumin ist mengenmäßig das wichtigste Plasmaprotein und macht beim Gesunden etwa zwei Drittel der Gesamtproteinkonzentration aus. Die Albuminsynthese findet ausschließlich in den Hepatozyten statt und ist ein wichtiger Parameter für die Hepatozytenfunktion [181]. Durch die Bestimmung des Mikroalbumins (MA) kann die Syntheseleistung der eingesetzten Hepatozyten abgeleitet werden. Die MA-Bestimmung ist der Nachweis von Albumin in sehr geringen Mengen (20-200 mg/l), welche durch das Medizinische Labor Rostock nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) durchgeführt wurde. Die kinetische Immunnephelometrie basiert auf einer Immunreaktion, bei der das MA gelöst im Zellkulturüberstand vorliegt und mit dem gegen MA gerichteten Antikörper unlösliche Antigen-Antikörper-Komplexe ausbildet.

Albumin (Probe) + Antikörper \longrightarrow [Albumin (Probe) - Antikörper (Aggregate)]

Beim MA-Test (in-vitro-Diagnostikum) wird die Geschwindigkeit der von den in der Lösung schwebenden Partikeln verursachten Streulichtzunahme mit einem Nephelometer (Image 800; Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) gemessen. Diese Partikel entstehen durch die Komplexbildung während der Antigen-Antikörper-Reaktion [182]. Am Versuchstag wurden 200 µl Zellkulturüberstand in sterile Eppendorfgefäße überführt. Bis zur MA-Bestimmung wurden diese Proben bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Aktivität von Enzymsystemen

3.4.3.1 Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP1A2

Das Cytochrom-P450-System spielt eine entscheidende Rolle beim Abbau von Arzneistoffen durch Oxidation. Der Metabolismus der meisten Medikamente wird durch Enzyme des Cytochroms katalysiert. Die Methode der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität (EROD) basiert auf der katalytischen Umwandlung von 7-Ethoxyresorufin in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin [183, 184]. Die EROD ist eine sehr häufig verwendete Modellreaktion zur Charakterisierung der Isoenzyme CYP1A1 und 1A2. Die spezifische O-Deethylierung des Phenooxazonderivates 7-Ethoxyresorufin in Gegenwart von NADPH + H⁺ und Sauerstoff erfolgt durch Übergang des am Cytochrom P450 aktivierten Sauerstoffs am α-C-Atom zum Heteroatom unter Bildung eines Halbacetals (Abb. 4). Diese wird wegen seiner geringen Stabilität zu Acetaldehyd und dem stark fluoreszierenden Resorufin gespalten. Aufgrund seiner Fluoreszenz kann Resorufin direkt im Kulturmedium detektiert und quantifiziert werden [185, 186].

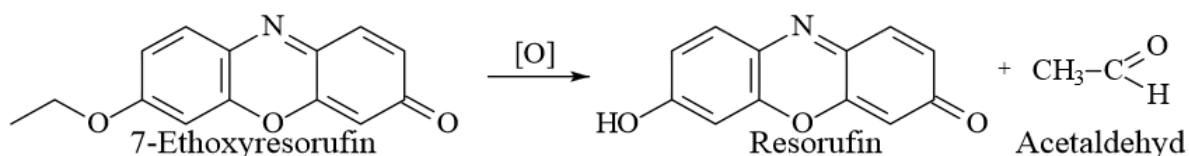


Abb. 4 Umwandlung von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Der EROD-Assay wurde nach Donato et. al. 1993a durchgeführt [163, 187]. Am Versuchstag wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und der Monolayer durch zweimaliges Spülen mit PBS von eventuellen Rückständen befreit. Anschließend wurden 500 µl neues DMEM mit 8 µmol/l Ethoxyresorufin und 10 µmol/l Dicumarol zu den Zellen gegeben. In der Inkubationszeit von einer Stunde bei Standardbedingungen im Brutschrank wurde ein Teil des Ethoxyresorufins von den HepG2/C3A-Zellen zu Resorufin umgewandelt. Das Dicumarol fungiert als Phase II Hemmstoff der DT Diaphorase und soll dabei weitere Verstoffwechselung des entstandenen Resorufin verhindern [188, 189]. Anschließend wurden 2 x 75 µl Zellkulturüberstand pro Well (Doppelbestimmung) in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und zusätzlich 15 µl/Well Natriumacetat-Puffer, der 15 Fishman Units β-Glucuronidase und 120 Roy Units Arylsulfatase enthält, dazugegeben. Die Lösung soll eventuell gebildete Resorufinkonjugate hydrolysieren [190, 191]. Der Ansatz in der 96-Well-Platte inkubierte schüttelnd (600 U/min) für weitere 3 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Zeit wurden 200 µl Ethanol (absolut) pro Well hinzugegeben, um die Reaktionen zu stoppen. Bei der Aktivitätsmessung am Fluorometer bei einer Wellenlänge von 530 / 584 nm wurden die Fluoreszenzen bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung wurde anhand einer Kalibriergerade durchgeführt, die durch Verdünnung einer Stammlösung von Resorufin (Blank – 10 pmol – 20 pmol – 40 pmol – 80 pmol) in Kulturmedium, hergestellt wurde. Die Resorufin-

Mengen berechnen sich mit Hilfe einer linearen Regressions-Kurvengleichung bedingt durch die Resorufin-Kalibrierkurve.

3.4.3.2 Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP3A4

Zusätzlich als Parametererweiterung zu den in Abschnitt 3.5 genannten Tests zur Analyse der Hepatotoxizität von Antimykotika wurde mit den Substanzen Anidulafungin, Fluconazol, Caspofungin, sowie Paracetamol in den entsprechenden Konzentrationen die Bestimmung der Cytochrom-Aktivität CYP3A4 durchgeführt.

CYP3A4 stellt quantitativ den Hauptanteil des hepatischen Cytochroms (30-40 %) dar und metabolisiert über die Hälfte alle therapeutisch applizierten Pharmaka, die den Phase-I-Metabolismus durchlaufen. Neben der Leber wird CYP3A4 auch im Darm exprimiert [192, 193]. Zur Aktivitätsbestimmung von CYP3A4 wird beispielsweise bevorzugt das fluorogene Substrat 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (7-BFC) verwendet, das zum korrespondierenden Fluorochrom-Produkt 7-Hydroxy-4-trifluormethyl-cumarin (7-HFC) debenzyliert wird [194, 195]. Die Wirksamkeit dieser CYP3A4-Substrate kann durch Induktoren und Inhibitoren von CYP 3A4 beeinflusst werden [196].

Zur Aktivitätsbestimmung von CYP3A4 wurde zusätzlich eine 24-Well-Platte mit Hepatozyten, die mit 10% FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, angesetzt. Dabei wurden 5×10^6 Zellen pro Well ausgesät. Die Testsubstanzen wurden nach 24-stündiger Adhärenz nach Absaugen des Überstandes pipettiert und für weitere 48 h im Brutschrank mit den Zellen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand pro Well abgesaugt und anschließend mit 1 ml PBS gespült. Es folgte die Zugabe von 500 µl 7-BFC in einer Konzentration von 100 µm pro Well. Nach 1 h Inkubation wurden 2x100 µl Überstand pro Well (Doppelbestimmung) und der Standard mit 7-HFC (Blank – 10 pmol – 20 pmol – 40 pmol – 80 pmol) in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Abschließend erfolgte die Messung am Fluorometer bei einer Wellenlänge von 355/538 nm. Mit Hilfe einer linearen Regressions-Geradengleichung wurden die Substrat-Mengen (7-HFC) ermittelt.

3.4.4 Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test)

Der XTT-Test ist ein nicht-radioaktiver, colorimetrischer Assay zur Bestimmung von Zellproliferation und -vitalität (Analyse der allgemeinen Stoffwechselaktivität). Die biochemische Methode basiert auf der Metabolisierung eines gelben Tetrazoliumsalzes in den orange-farbenen Formazan-Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen [197]. 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid, kurz XTT, wird nur von metabolisch aktiven Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Farbstoff reduziert und wird dabei direkt ins das Kulturmedium abgegeben und kann quantitativ im Photometer bestimmt werden. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen [198].

Aufgrund seiner negativen Ladung kann XTT nicht in Zellen eindringen. Die Reduzierung erfolgt auf der Zell-Außenseite durch einen Elektronentransport über die Zellmembran (Abb. 5). Der erfasste Zellzustand entspricht im Wesentlichen dem NADH-Status, welcher zum Großteil aus dem Citratzyklus in Mitochondrien stammt [199, 200]. Die Ladung wird auf der Zell-Außenseite durch Plasmamembran-Oxidoreduktasen übertragen. XTT kann alleine zur Nachweisreaktion verwendet werden, erzielt aber besser Assay-Ergebnisse in Kombination mit einem intermediären Elektronen-Akzeptor wie Phenazinmetho-sulfat (PMS). Das Aktivierungs-reagenz PMS nimmt an der Zelloberfläche (oder in der Plasmamembran) Elektronen von Plasmamembran-Oxidoreduktasen aus und bildet eine reaktive Zwischenstufe, welche die Reduktion von XTT außerhalb der Zelle vermittelt [201].

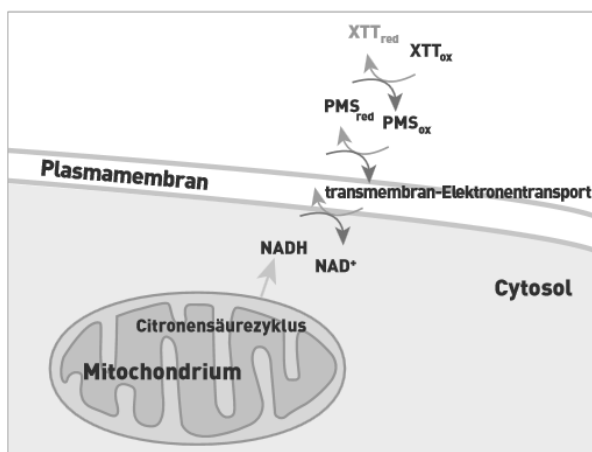


Abb. 5 Schema der Bildung von reduziertem Formazan-Farbstoff (XTT_{red}). NADH führt aus den Mitochondrien über einen Plasmamembran-Elektronentransport wieder um zur Reduktion von PMS auf der Zell-Außenseite. PMS überträgt Elektronen schließlich auf XTT [199]

Am Testtag wurden zwei verschiedene Varianten (indirekt / direkt) der Bestimmung der Stoffwechselaktivität durchgeführt, um die noch vorhandene Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen von adhären und nicht-adhären Zellen einzuschätzen. Dabei wurde im ersten Ansatz die Aktivität nicht-adhären Zellen in der 24-Well-Platte im indirekten Test bestimmt. Es wurden 100 µl des XTT-Reagenzes (bestehend aus XTT labeling reagent und electron-coupling reagent, im Verhältnis 50:1 (v/v)) zu 100 µl Zellkulturüberstand/ Well mit nicht adhären Zellen (Doppelbestimmung pro Well) in eine transparente 96-Well-Platte gegeben. Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingung erfolgte die spektrophotometrische Messung am Photometer bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm und einer Absorptionswellenlänge von 450 nm. Die Absorptionswerte sind proportional zu der Konzentration des Formazan-produktes. Da die Umwandlung bei toten Zellen durch ihre inaktiven Mitochondrien nicht stattfindet, ist der gemessene Wert gleich der Stoffwechselaktivität der lebenden Zellen. Umso mehr aktive vitale Zellen, desto höher der gemessene Wert. Im zweiten Ansatz wurde die Stoffwechselaktivität im direkten Test von den nach Trypsinierung abgelösten Zellen (adhären Zellen) der 24-Well-Platte in Suspension bestimmt. In dem Zusammenhang wurden 100 µl Zellsuspension/Well

(siehe Abschnitt 3.6.1.1) mit 100 µl XTT-Reagenz in eine durchsichtige 96-Well-Platte als Doppelbestimmung pipettiert und nach 1 h Inkubation unter Standard-bedingungen spektrophotometrisch am Photometer gemessen.

3.4.5 Zelluntergang – Apoptose / Nekrose

Ein weiterer zusätzlicher Parameter zur Einschätzung des hepatotoxisches Potenzials von Medikamenten ist der Zelluntergang. Einerseits kann die Hepatotoxizität auf apoptotischen Vorgängen beruhen, anderseits auf nekrotischen.

Der pathologische Prozess ist die Nekrose, die durch unphysiologische Bedingungen (Hitze, Strahlung, extreme Veränderungen der physiologischen Bedingungen, Toxine, inflammatorische Reize) zur Zerstörung der Zellmembran und zur Freisetzung des Zytosols führen kann [202–204]. Die Apoptose, „programmierter“ Zelltod, ist ein natürlicher und stereotyp ablaufender Prozess, der an einer Vielzahl lebenswichtiger Prozesse beteiligt ist und durch spezifische morphologische Veränderungen der Zellen gekennzeichnet ist: Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentation und Zellschrumpfung mit Ausbildung von membranumschlossenen Vesikeln („apoptotic bodies“) [205]. Apoptose kann grundsätzlich über zwei wichtige Mechanismen induziert werden: über den Death-Rezeptor vermittelten (extrinsischen) oder den mitochondrialen (intrinsischen) Aktivierungsweg. Während dieser Prozesse werden bestimmte Enzyme, wie Caspasen und Endonucleasen aktiviert, welche Proteine und Chromatin spalten und die apoptotischer Zelluntergang einleiten [206, 207].

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in zusätzlichen Versuchsreihen die Substanzen Liposomales Amphotericin B, Anidulafungin, Caspofungin und Fluconazol hinsichtlich des apoptotischen Potenzials (DNA-Fragmentierung und CD95-Expression) getestet.

3.4.5.1 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Apoptose wurde im Rahmen dieser Arbeit am Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm CellQuest™ Pro benutzt.

Die Untersuchung von Zellen im Durchflusszytometer (FACS: „Fluorescence Activated Cell Sorter“) erlaubt die quantitative und qualitative Erfassung von zellulären Charakteristika auf Einzelzellniveau innerhalb einer größeren Zellpopulation. Die Grundlage einer FACS-Analyse ist eine (gefärbte) Zellsuspension. Die darin enthaltenen Zellen passieren mit Überdruck die Messkammer und werden einzeln von einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Das Vorwärtstreulicht (FSC, forward scatter channel) ist dabei proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtstreulicht (SSC, side scatter channel) Auskunft über die Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis und äußerer Form der Zelle gibt. Weiterhin erhält man Informationen über die Fluoreszenz-

intensitäten der an- oder eingelagerten Farbstoffe (FL1, FL2, FL3). Die Streulicht-Messergebnisse werden in einem Dot Plot dargestellt [208].

3.4.5.2 Nachweis DNA-Fragmentierung mit der TUNEL-Methode

Im späteren Verlauf der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen, die die Chromatinstruktur des Zellkerns in 300 kb-Fragmente bis hin zu DNA-Stücke von 50 bp Länge spalten. Mit der TUNEL (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling)-Färbung können diese DNA-Fragmente detektiert werden. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Anlagerung von fluoreszierenden Desoxyuridintriphosphat (FITC-dUTP) an die freien 3-Hydroxyl-Enden doppel- oder einzelsträngiger DNA, gleichzeitig wird die gesamte DNA mit Propidium-Iodid (PI) gefärbt. Nichtapoptotische Zellen inkorporieren keine signifikanten Mengen von FITC-dUTP, da sie weniger 3-Hydroxyl-Enden besitzen, im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, die stark angefärbt werden.

Zur Bestimmung der freien DNA-Fragmente wurde das APO-DIRECT™ Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 1×10^6 Zellen pro ml in eine 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h Adhärenz wurden die Testsubstanzen hinzugegeben. Um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen der 24-Well-Platte nach weiteren 24 h Inkubation durch Trypsinierung abgelöst, pelletiert und für 45 min mit 1 ml 1 % Paraformaldehyd auf Eis fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in 1 ml eiskalten 70 % Ethanol bei -20°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die fixierten Zellen durch Entfernung des Ethanol, sowie zusätzliche Wasch- und Zentrifugationsschritte mit 50 μl DNA-Färbelösung (bestehend aus 10 μl TdT-Reagenz, 0,75 μl TdT-Enzym, 8 μl FITC-dUTP und 32 μl H_2O bzw. Vielfachen davon) für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit dem Rinsing Puffer gespült und die Zellen mit 300 μl PI/RNase Färbungspuffer für 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur versetzt. Die gefärbte Zellsuspension wurde innerhalb von drei Stunden im Durchflusszytometer mit 5000 Events pro Messung bei 520 nm (FITC, FL-1) bzw. 623 nm (PI, FL-2) gemessen. In der Abb. 6 wird die durchflusszytometrische Analyse der TUNEL-Färbung und Auswertung beschrieben.

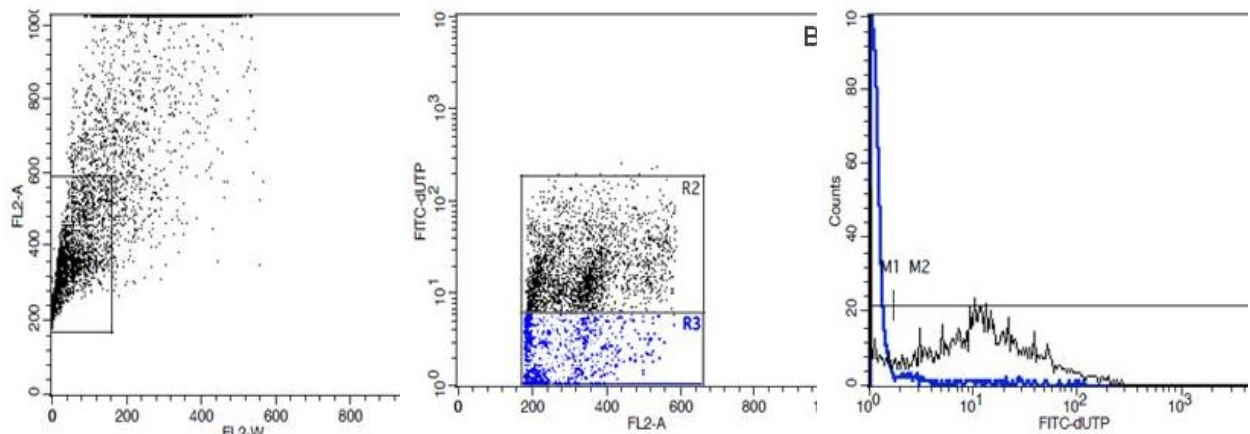


Abb. 6 Detektion der 3'-OH-Enden durch TUNEL-Färbung und FACS-Analyse. Im Streudiagramm A wurden alle Zellen als Dot Plots dargestellt. Das DNA Area Signal (FL2-A) wurde auf der y-Achse und das DNA Width Signal (FL2-W) auf der x-Achse aufgetragen. Das Gate R1 wurde auf die nicht verklumpten Zellen gelegt. In B wurde der DNA-Gehalt der Einzelzellen (FL2-A, PI) gegen die Anzahl der Strangbrüche (Fluoreszenzintensitäten der FITC-dUTP, FL-1) aufgetragen. Im Streudiagramm B wurden im unteren Fenster R3 in die lebenden Zellen (=negativ, DNA-haltig) und im oberen Fenster R2 in die apoptotischen Zellen (=positiv, Strangbruch-Einbau) unterschieden. Apoptotische Zellen wiesen eine stärkere TUNEL-Fluoreszenz als gesunde Zellen auf. C Die Darstellung der Zellen im Histogramm erfolgte aus dem Gate R2 und R3 als Overlay. Dabei wurde der Marker M2 (prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen) an dem Ende vom Marker M1 (prozentualer Anteil der lebenden Zellen) gelegt. Die Prozentangaben wurden in einem Statistik-Histogramm angegeben.

3.4.5.3 Charakterisierung des CD95-Rezeptors

CD95 (Cluster of differentiation 95), auch APO-1 (apoptosis-1) oder Fas (fibroblast associated) genannt, ist ein transmembranes Protein vom Typ I und verfügt über eine cysteinreiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine cytoplasmatische Todesdomäne (DD). Der Zelloberflächenrezeptor ist Teil der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Familie (TNFR – tumor necrosis factor receptor family) und kann durch Bindung des Liganden Apoptose auslösen. Neben anderen Todesrezeptoren wird auch CD95 in der Leber ubiquitär exprimiert, dabei scheint seine Funktion von herausragender Bedeutung. CD95 ist hauptsächlich im Zytoplasma von unstimulierten Hepatozyten vorhanden und nur gering-fülig in der Zellmembran [209–211]. Auf der Oberfläche der Hepatozyten wurde mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers die CD95-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden 1×10^6 Zellen pro 1 ml Kulturmedium, sowie mit Plasma versetzten Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät und bei Standardbedingungen 24 h inkubiert. Danach wurden die Testsubstanzen für weitere 24 h zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet, mit 1 ml 1 % FKS/PBS gewaschen und 5 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension pro Testkonzentration wurde auf zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt. Dabei wurden einerseits 100 µl Zellsuspension mit 10 µl der Isotypenkontrolle FITC MOUSE IgG1k versetzt und andererseits 100 µl mit 10 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Anti-Human-CD95 monoklonalen Antikörper aus

der Maus. Die Zellen beider Ansätze der jeweiligen Testkonzentration wurden 30 min bei 4°C dunkel inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml 1% FKS/PBS gewaschen, 5 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit 200 µl PBS resuspendiert und durchfluss-zytometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm analysiert. In Abb. 7 wird die CD95-Rezeptorexpressions-Analyse durchfluss-zytometrisch erläutert.

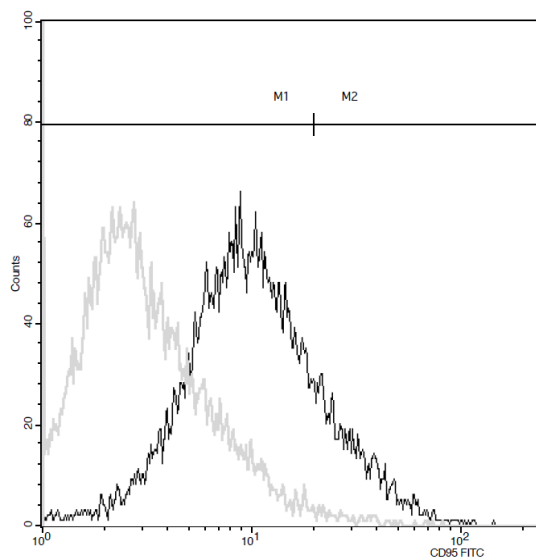


Abb. 7 Detektion der CD95-Rezeptorexpression. In dem Histogramm wurde die relative Zellzahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität CD95-FITC (x-Achse) aufgetragen. Dabei wurde die Färbung der Zellen mit dem Isotyp-Kontroll-antikörper FITC IgG1 (hellgraue Kurve) mit der FITC Mouse Anti-Human CD95-Färbung (schwarze Kurve) verglichen. Die detektierbare Rechtsverschiebung (spezifische Bindung, erhöhte Fluoreszenzintensität) gegenüber der Isotypenkontrolle (unspezifische Bindung) belegte die Expression von CD95-Rezeptoren. Der Marker M2 zeigte den prozentualen Anteil an CD95-exprimierten Zellen. Das Kurvenende der Isotypenkontrolle (Marker M1, hellgrau) wurde als Schnittpunkt der Marker gewählt. Die Prozentangaben wurden in einem Statistik-Histogramm angegeben.

3.5 Test-Validierung mit primären isolierten Hepatozyten

3.5.1 Versuchsübersicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Teil-Validierung der Ergebnisse mit primär isolierten humanen Hepatozyten in Kooperation mit der Firma Primacyt in Schwerin durchgeführt. Dabei wurden die humanen primär isolierten Hepatozyten von zwei unterschiedlichen Spendern durch Perfusion humaner Leberresektate erhalten. Während die Leber intakt blieb und somit die in vivo-Situation widerspiegelte [212, 213]. Es wurde die Zellvitalität und CYP1A2-Induktion von vier Testsubstanzen bestimmt. Parallel erfolgte in den unbehandelten Kontrollzellen die Messung der Harnstoff- und Albuminfreisetzung als Funktions-parameter zur Qualitätskontrolle der eingesetzten humanen Hepatozyten.

In der Tab. 7 ist das Lösen der Substanzen zur Herstellung der Stamm-, Arbeits- und Gebrauchslösungen zusammengefasst. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Tab. 7 Herstellung der Stamm-, Arbeits- und Gebrauchslösungen für die Testsubstanzen

Lösungen Substanzen	Stammlösung (SL)	Arbeitslösung (AL)	Gebrauchslösung (GL)
CASPOFUNGIN (50 mg) Cancidas / Pfizer	50 mg in 10 ml	100 µg/ml	10 µg/ml = 50 µl AL + 450 µl HHMM
	sterilem dest. H ₂ O	100 µl SL + 4900 µl HHMM	5 µg/ml = 25 µl AL + 475 µl HHMM
	5 mg/ml		1 µg/ml = 5 µl AL + 495 µl HHMM
Fluconazol (200 mg/100ml) ratiopharm	Infusionslösung	900 µg/ml	90 µg/ml = 50 µl AL + 450 µl HHMM
	2 mg/ml	450 µl SL + 550 µl HHMM	45 µg/ml = 25 µl AL + 475 µl HHMM
			5 µg/ml = 5 µl AL + 495 µl HHMM
Paracetamol Acetaminophen / Sigma-Aldrich	1,209 g in 10 ml	152,4 mM	15,24 mM = 50 µl AL + 450 µl HHMM
	Ethanol (99 %)	191 µl SL + 810 µl HHMM	7,62 mM = 25 µl AL + 475 µl HHMM
	800 mM		1,52 mM = 5 µl AL + 495 µl HHMM
ANIDULAFUNGIN (100 mg) Ecalta / Pfizer	100 mg in 30 ml	750 µg/ml	75,0 µg/ml = 50 µl AL + 450 µl HHMM
	sterilem dest. H ₂ O	225 µl SL + 775 µl HHMM	37,5 µg/ml = 25 µl AL + 475 µl HHMM
	3,33 mg/ml		7,5 µg/ml = 5 µl AL + 495 µl HHMM

HHMM - Human Hepatocyte Maintenance Medium

3.5.2 Testparameter

3.5.2.1 Zellvitalität - MTT Assay

Die Bestimmung der Zellvitalität wurde mit dem MTT-Test in 96-Well-Platten durchgeführt. MTT ist ein dem XTT ähnliches gelbes Tetrazoliumsalz, das bei der Metabolisierung nur durch vitale und metabolisch aktive Zellen, mit dem Unterschied zu XTT in das unlösliche violettfarbene Formazan umgewandelt wird. Dabei sind die intrazellulären Enzyme und die Cofaktoren NADH und NADPH beteiligt. Es wurden 50.000 Zellen/ Well in 100 µl Hepatozyten-Plattiermedium in eine 96-Well ausplattiert. Nach einer 4 h Adhärenzzeit wurde der Monolayer einmal mit PBS gespült und anschließend wurden 50 µl Human Hepatocyte Maintenance Medium (HHMM)/Well pipettiert. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte in Sechsfachbestimmung pro Konzentration am ersten Tag. Nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte die MTT-Bestimmung, dabei wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml)/Well ins Kulturmedium gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und das intrazelluläre gebildete Formazan wurde durch die Zugabe von 130 µl Desorb-Lösung (0,7 % SDS in Isopropanol) nach 15 min orbitalem Schütteln gelöst. Bei einer Wellenlänge von 595 nm (Referenz 655 nm) wurde am Biorad Mikrotiterplattenphotometer (Modell 680) die Lichtabsorption durch Formazan bestimmt. Eine Indikation für reduzierte Zellvitalität ist die Reduktion der Absorption in behandelten gegenüber unbehandelten Zellen.

3.5.2.2 EROD-Assay und Proteinbestimmung

Zur Überprüfung der Funktionalität der primär isolierten Hepatozyten (Bestimmung der CYP1A2-Aktivität) wurden 300.000 Zellen/Well in eine collagenbeschichtete 24-Well-Platte ausplattiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag, am dritten Tag wurden die Testsubstanzen in Dreifachbestimmung pro Konzentration für 48 h hinzugegeben. Am vierten Tag wurde das Medium unter erneuter Zugabe der Testsubstanzen gewechselt. Am fünften Tag erfolgte die Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD-Assay). Parallel wurde Zellkulturüberstand der Negativkontrollen bei 4 °C bis zur weiteren Analyse der Harnstoff- und Albuminkonzentration gelagert. Das restliche Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden 500 µl Inkubationspuffer/Well zu den Zellen gegeben. Während der Inkubation (1 h, 37 °C) wurde das Referenzsubstrat Ethoxyresorufin zu Resorufin metabolisiert, dabei verhindert das enthaltene Dicumarol, Phase II-Inhibitor, eine weitere Verstoffwechselung des Resorufins. Die Menge des gebildeten Resorufin im Puffer wurde fluorometrisch am BMG Labtech Fluostar Optima Mikroplattenlesegerät bei einer Extinktionswelle von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm detektiert. Es wurde eine Standardreihe von 1-3000 nM Resorufin angesetzt. Als Positivkontrolle wurde 25 µM β -Naphthoflavon verwendet.

Zur Proteinbestimmung wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Zellen wurden mit 500 µl 0,1 M NaOH-Lösung geerntet und zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4 °C). 2x25 µl (Doppelbestimmung) des Überstandes, welcher die löslichen Proteine enthält, wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und 1 h mit 200 µl Reagenzlösung bei 37 °C inkubiert. Eine Standardreihe mit 0-1000 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin) wurde mitgeführt.

3.5.2.3 Bestimmung der Harnstoff- und Albuminkonzentration

Zur Quantifizierung des von den Zellen produzierten und in das Zellkulturmedium freigesetzten Harnstoffes als Endprodukt des Stickstoffwechsels wurde das QuantiChrom Urea Assay Kit (Bio Assay System) verwendet. Die Proben wurden als Doppelbestimmung photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert.

3.5.2.4 Bestimmung der Albuminkonzentration

Die Albuminproduktion gilt als Alleinstellungsmerkmal der Hepatozyten und kann neben der Produktion von Harnstoff als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der Funktionalität herangezogen werden. Die Albuminkonzentration wurde im Zellkulturüberstand als Doppelbestimmung mittels ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) getestet. Dabei wurden spezifisch für humanes Albumin Antikörper der Firma Bethyl verwendet. Ein goat-anti-human albumin (affinity purified) Antikörper wurde an eine 96-Well Platte mit hoher Proteinbindungskapazität gekoppelt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden freie Stellen mit Rinderserumalbumin blockiert. Im Anschluss wurden die Proben, die 1:200 bis 1:1200 in Proben-Konjugat-Puffer

verdünnt und die Standardreihe (1,56-400 ng/ml humanes Albumin) aufgetragen. Das in den Proben vorhandene Albumin bindet an die Antikörper auf der Platte. Das Enzym HRP (Meerrettichperoxid) ist an dem goat-anti-human Albumin Antikörper gekoppelt und dient zur Quantifizierung des gebundenen Albumins. Dieses Enzym setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt um. Dieses wurde nach dem Stoppen der Reaktion (Farbumschlag von blau nach gelb) photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm am Biorad Photometer bestimmt.

3.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden alle erhobenen Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Median mit 25. und 75. Perzentil angegeben. Zum Vergleich der Gruppen wurde als Vortest der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Der nichtparametrische Test für unabhängige Stichproben überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen von mehr als zwei verschiedenen Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Anschließend erfolgte der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test, um herauszufinden, ob sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Es wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau für alle statistischen Tests festgelegt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 22.0 und die grafische Darstellung mit Sigma Plot 15.0.

4 ERGEBNISSE

4.1 Master- und Workingzellbank

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde eine Master- und Workingzellbank von der HepG2/C3A-Zelllinie von der ATCC (American Type Culture Collection) erstellt. Dazu war es notwendig diese Zellen gegen die zuvor genutzte Zelllinie hinsichtlich Funktionalität, Vitalität, Zellzahl und molekulargenetischer Faktoren zu testen. Durch die Fragmentlängenanalyse wurde eine Übereinstimmung aller Short Tandem Repeat (STR)-Marker der beiden Zelllinien bestätigt. Lediglich beim Marker D16S539 wurde eine Abweichung der gemessenen Allellängen (13/14) gegenüber den erwarteten Werten (12/13) festgestellt. (siehe Anhang Tab. 21) Aus molekulargenetischer Sicht sind die untersuchten Zelllinien HepG2/C3A von der ATCC und HepG2/C3A mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identisch. Aufgrund des direkten Vergleiches der Zelllinien, ist die beobachtete Abweichung beim Marker D16S539, die innerhalb des Toleranzbereiches der Untersuchung (+/-1) liegt, nicht von Bedeutung. Bei der mikrobiologischen Untersuchung der Zelllinien wurden keine Bakterien und Pilze in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Die verwendeten Zellen waren frei von Mycoplasmen. Der quantitative Nachweis (Viruslastbestimmung) von CMV (Cytomegalie-Virus), EBV (Epstein-Barr-Virus) und HBV-DNA (Hepatitis-B-Virus) im Zellkulturüberstand mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) war negativ. Die Ergebnisse der molekulargenetischen Bestimmung von HIV-1-RNA (Humane Immundefizienz-Virus) mittels quantitativer real-time-PCR, sowie die Ergebnisse des quantitativen Nachweises von HCV-RNA durch die Cobas TaqMan-Technologie waren ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zellen konnten aufgrund der negativen Messwerte der mikrobiologischen Analyse ohne Bedenken eingesetzt werden. Abschließend erfolgten Tests zur Überprüfung der Vitalität und Funktionalität der Zellen nach dem Schema eines Standard-Assays zur Toxizitätsüberprüfung. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 8) sind die Messwerte der jeweiligen Bestimmung dargestellt.

Tab. 8 Messwerte der Funktionsüberprüfung zum Aufbau der Masterzellbank | n=9, Median, 25/75 Perzentil

Parameter	Zelllinie HepG2/C3A (ATCC)	HepG2/C3A
Zellzahl/ml (x 100 000)	7,6 5,8 / 10,7	7,0 6,1 / 7,4
LDH [U/l] Tag 6	121 99 / 135	148 102 / 157
Vitalität [%]	95 94,8 / 96,3	94 91,8 / 95,4
XTT [Extinktion/ml]	0,78 0,69 / 0,98	0,98 0,81 / 1,12
Mikroalbumin [mg/l]	5,5 5,4 / 5,9	7,1 6,5 / 8,2
Ethoxyresorufin [pmol/l]	3,9 2,9 / 4,7	3,2 2,3 / 4,2

LDH – Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

Da keine signifikanten Unterschiede bei den Parametern auftraten, konnten die HepG2/C3A als Testzellen für den Mikrotiterplatten-Assay zur Überprüfung der Hepatotoxizität eingesetzt werden.

4.2 Parameter des Hepatotoxizitätstest

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Hepatotoxizitäts-Überprüfung der handelsüblichen Zubereitungen der Antimykotika mit den entsprechenden Konzentrationen (vgl. Tab. 5 im Kapitel 3.1.1) dargestellt. Im Vordergrund steht die maximale Plasmakonzentration C_{\max} , da diese für die klinische Anwendung von großer Bedeutung ist. Weiterhin wurden im Vergleich der Antimykotika für die jeweiligen Parameter eine negative und eine positive Kontrolle in den Diagrammen mitgeführt. Die Negativkontrolle ist das verwendete Kulturmedium DMEM mit einem Zusatz von 10 % oder 15 % FKS. Die Positivkontrolle ist Paracetamol mit einer Konzentration von 15,24 mM im Kulturmedium bzw. Plasma. Im Rahmen der Promotion wurden Testansätze mit Kulturmedium und selbst hergestelltes Plasma durchgeführt. Aufgrund der großen Datenmenge werden in dem Ergebnisteil nur die Versuche mit Kulturmedium präsentiert, während die Versuchsansätze mit dem Plasma beschrieben und im Anhang als Tabellen dargestellt werden.

4.2.1 Bestimmung von Vitalität und Proliferation

4.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Bestimmung der Zellzahl im Medium

Aufgrund der Zellzahlbestimmung konnte ein Einfluss auf das Proliferationsverhalten der HepG2/C3A-Zellen in der C_{\max} -Konzentration gezeigt werden. Die Abb. 8 stellt die Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation dar. Während bei der Negativkontrolle im Durchschnitt $6,8 \times 10^5$ Zellen/ml zu finden waren, sank bei Fluconazol und Voriconazol die Zellzahl signifikant ab. Das Liposomale Amphotericin B und Caspofungin zeigten kaum Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Bei Anidulafungin war keine Beeinträchtigung der Zellzahl zu erkennen, lediglich ein leichter positiver Trend (4 % über Negativkontrolle) war zu beobachten. Bei der Positivkontrolle kam es zu einem Zellverlust um etwa 81 %.

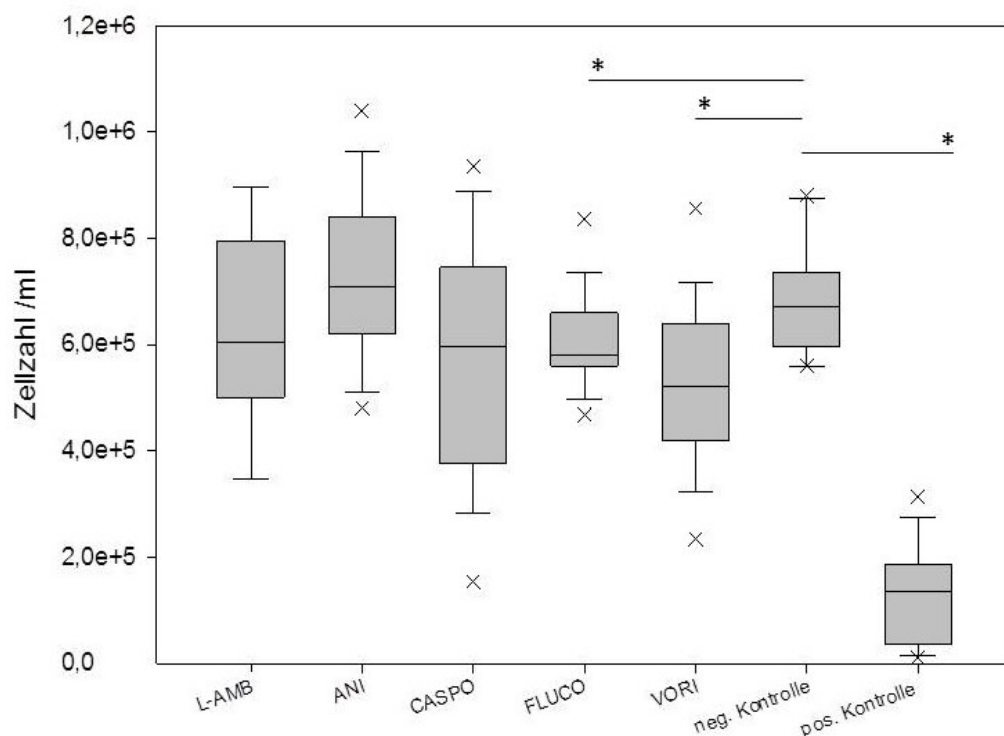


Abb. 8 Darstellung der Zellzahlen/ml in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Vitalität im Medium

Im Vergleich zu der Negativkontrolle mit einer Durchschnittsvitalität von 94 % war bei allen Testsubstanzen in der C_{max} -Konzentration ein signifikanter Vitalitätsverlust erkennbar (Abb. 9). Die Testsubstanz Voriconazol wies mit nur 67,4 % vitaler Zellen das höchste Schädigungspotenzial auf. Ähnliche Verluste wurden durch Fluconazol (75 %) und Liposomales Amphotericin B (72,7 %) erzielt. Weniger schädigend waren Anidulafungin (79,8 %) und Caspofungin (91,2 %). Durch die Inkubation mit der Positivkontrolle Paracetamol im Medium waren im Durchschnitt nur noch 37,7 % der Zellen vital.

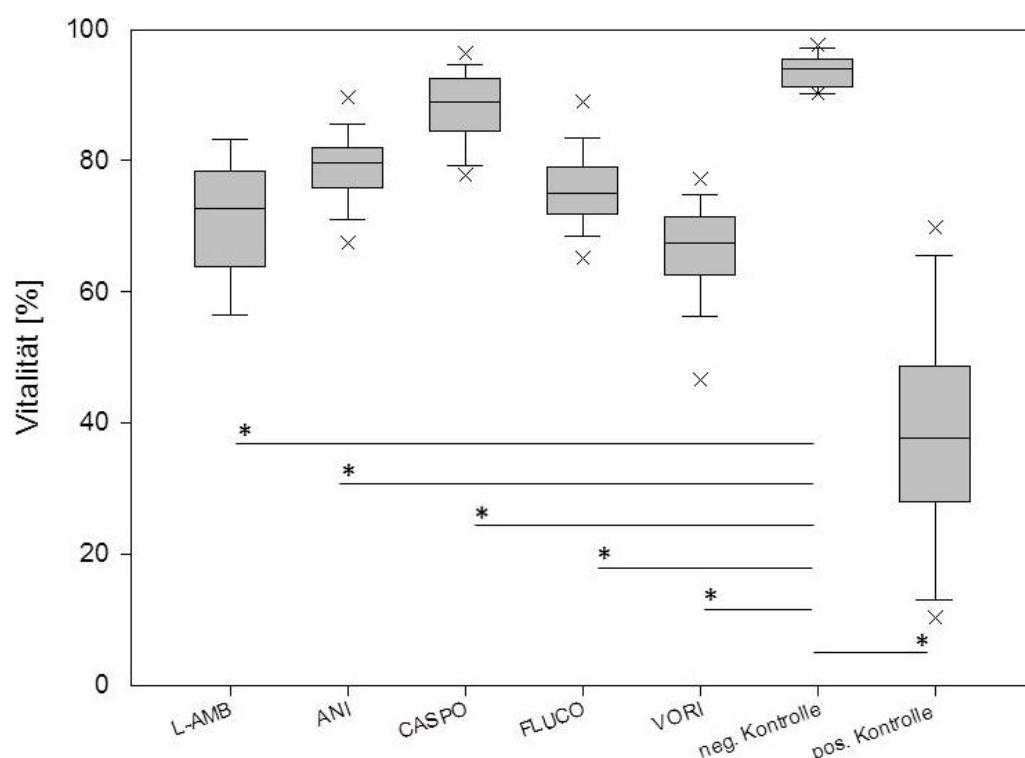


Abb. 9 Darstellung der Vitalität [%] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Zellzahl und Vitalitäts-Bestimmung mit steigender Konzentration

Bei der Betrachtung der Zellzahl und der Vitalität mit steigender Konzentration der Testsubstanzen ($5 \times C_{max}$, $10 \times C_{max}$) konnten nur weitere signifikante negative Beeinflussungen bei der Testsubstanz Anidulafungin nachgewiesen werden (Abb. 10 A und 10 B). Sah man bei der C_{max} -Konzentration noch ein der Negativkontrolle ähnliches Bild, fielen die Zellzahl und auch die Vitalität signifikant stark ab. Bei dem Einsatz von der 10-fachen C_{max} -Konzentration konnten keine Zellen mehr detektiert werden. Beim Liposomalen Amphotericin B konnte trotz schlechter Ausgangsvitalität bei der C_{max} -Konzentration ein positiver Trend verzeichnet werden. Bei der fünffachen C_{max} -Konzentration wurde eine Vitalität von 85,8 % und bei der zehnfachen C_{max} -Konzentration eine Vitalität von 86,8 % ermittelt. Die Zellzahl mit anfangs $6,3 \times 10^5$ ist auf $10,9 \times 10^5$ Zellen/ml gestiegen.

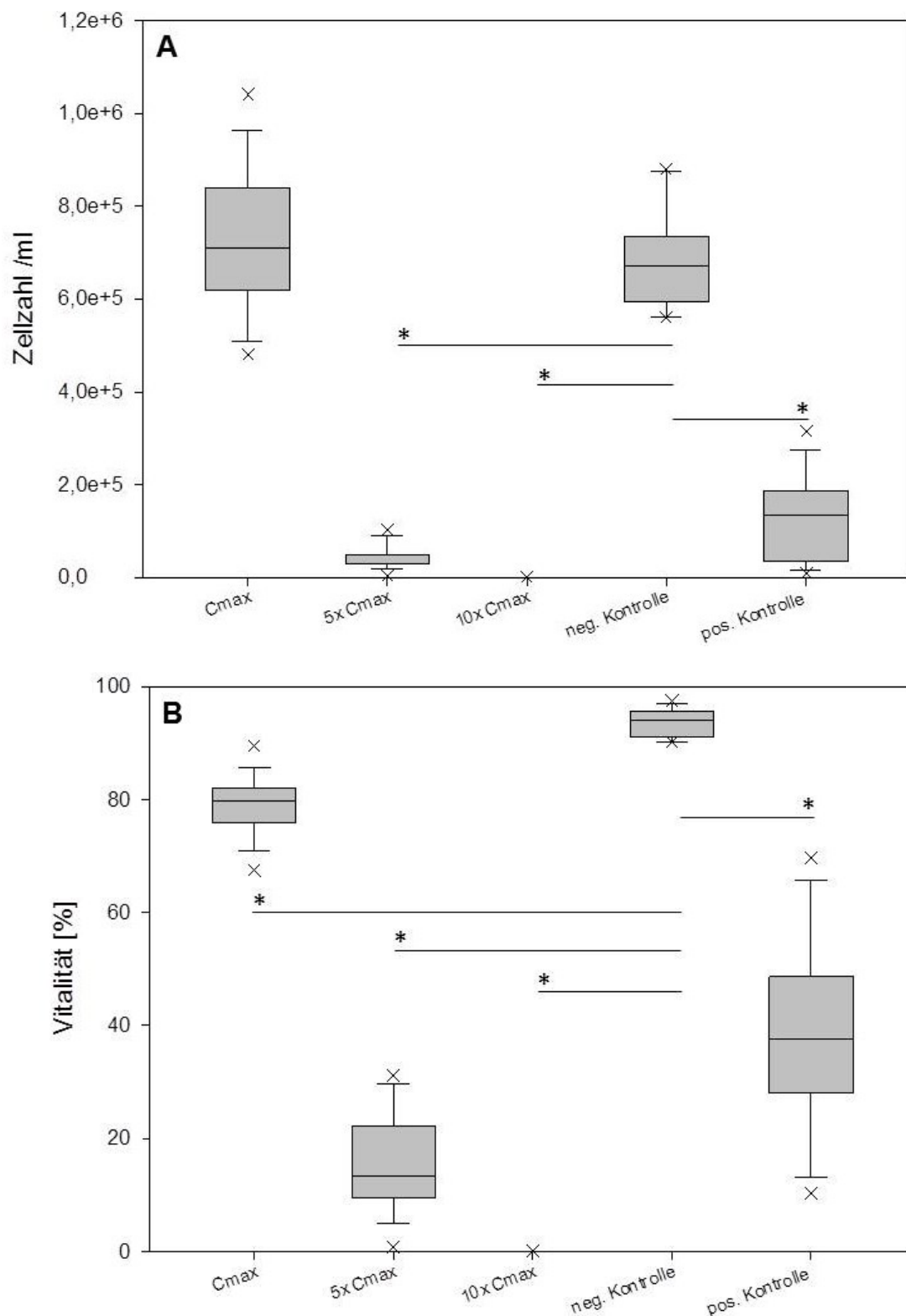


Abb. 10 A| Darstellung der Zellzahl/ml von Anidulafungin und B| Darstellung der Vitalität [%] von Anidulafungin. Auf der x-Achse sind C_{max} (2,25 mM), 5x C_{max} (11,25 mM), 10x C_{max} (22,5 mM) im Medium, sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Bestimmung der Zellzahl und Trypanblaufärbung zur Vitalitätsbestimmung im Plasma

Bei den Versuchsreihen mit Plasma wurden insgesamt höhere Vitalitäten und Zellzahlen ermittelt (Tab. 9). Die Negativkontrolle Plasma hat im Durchschnitt eine Vitalität von 90,9 %. Bei allen Testsubstanzen mit Ausnahme von Caspofungin (91,2 %) wurde in der C_{\max} -Konzentration ein signifikanter Verlust der Vitalität analysiert. Dabei besaßen Voriconazol (78,9 %) und Fluconazol (78,4 %) auch im Plasma, auch wenn nicht so stark, wie im Medium beobachtet, ein Schädigungspotenzial. Durch die Inkubation mit dem Liposomalen Amphotericin B (83,5 %), sowie mit Anidulafungin (84,2 %) wurden die Zellen in einem geringen Ausmaß geschädigt. Bei der Positivkontrolle Paracetamol im Plasma waren lediglich 18,1 % der Zellen noch vital.

Tab. 9 Übersicht über Zellzahl/ml und Vitalität [%] der Plasmaversuche der verwendeten Testsubstanzen, sowie pos. + neg. Kontrolle | Median, 25/75 Perzentil, *: $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle

Parameter Testsubstanz	Zellzahl /ml (x 100 000)			Vitalität [%]		
	verwendete Konzentrationen			verwendete Konzentrationen		
	C_{\max}	5x C_{\max}	10x C_{\max}	C_{\max}	5x C_{\max}	10x C_{\max}
Liposomales Amphotericin B (5,72 mM 28,63 mM 57,25 mM)	7,3 * 5,7 / 7,7	11,2 * 10,4 / 12,2	11,3 * 9,4 / 13,2	83,5 * 78,2 / 86,7	86,9 * 84,2 / 90,1	88,0 * 85,8 / 90,1
Anidulafungin (2,25 mM 11,25 mM 22,50 mM)	7,4 * 6,5 / 8,7	2,0 * 1,9 / 3,4	0,2 * 0,1 / 0,3	84,2 * 82,1 / 89,1	65,4 * 53,3 / 73,5	20,0 * 10,4 / 34,5
Caspofungin (0,2 mM 1,0 mM 2,0 mM)	5,7 * 4,4 / 7,3	6,5 5,0 / 7,4	5,6 * 4,4 / 6,9	91,2 88,8 / 93,1	92,6 85,5 / 94,8	92,4 84,5 / 93,7
Fluconazol (4,5 mM 22,5 mM 45,0 mM)	5,0 * 4,0 / 5,8	4,6 * 4,2 / 5,8	5,6 * 5,0 / 6,1	78,4 * 75,4 / 80,8	73,4 * 75,5 / 81,4	76,5 * 74,4 / 79,9
Voriconazol (0,25 mM 1,25 mM 2,5 mM)	5,0 * 4,6 / 5,8	5,2 * 4,8 / 6,0	5,1 * 4,2 / 5,6	78,9 * 76,2 / 81,0	78,1 * 76,9 / 81,1	77,5 * 74,1 / 80,5
neg. Kontrolle	6,5 5,4 / 6,9			90,9 89,5 / 92,3		
pos. Kontrolle	0,3 * 0,2 / 0,5			18,14 * 8,1 / 37,8		

Der Anteil lebender Zellen bei den Versuchen im Plasma versus den Versuchen im Kulturmedium war bei den C_{\max} -Konzentrationen bei allen Testsubstanzen höher. Der größte Unterschied wurde bei Voriconazol mit einer Steigerung von 11,5 % und beim Liposomalen Amphotericin B von 10,8 % beobachtet. Bei den anderen Testsubstanzen sind die Vitalitäten nur geringfügig gestiegen. Im Vergleich zu den Mediumansätzen kam es auch nur bei ansteigender Konzentration von Anidulafungin zu einem starken und signifikanten Abfall der Zellzahl und der Vitalität (siehe Tab. 9).

4.2.1.2 Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Freisetzung von LDH im Medium

In Abb. 11 ist die Bestimmung der LDH-Werte nach Tag 3 und nach Tag 6 jeweils in der C_{\max} -Konzentration dargestellt.

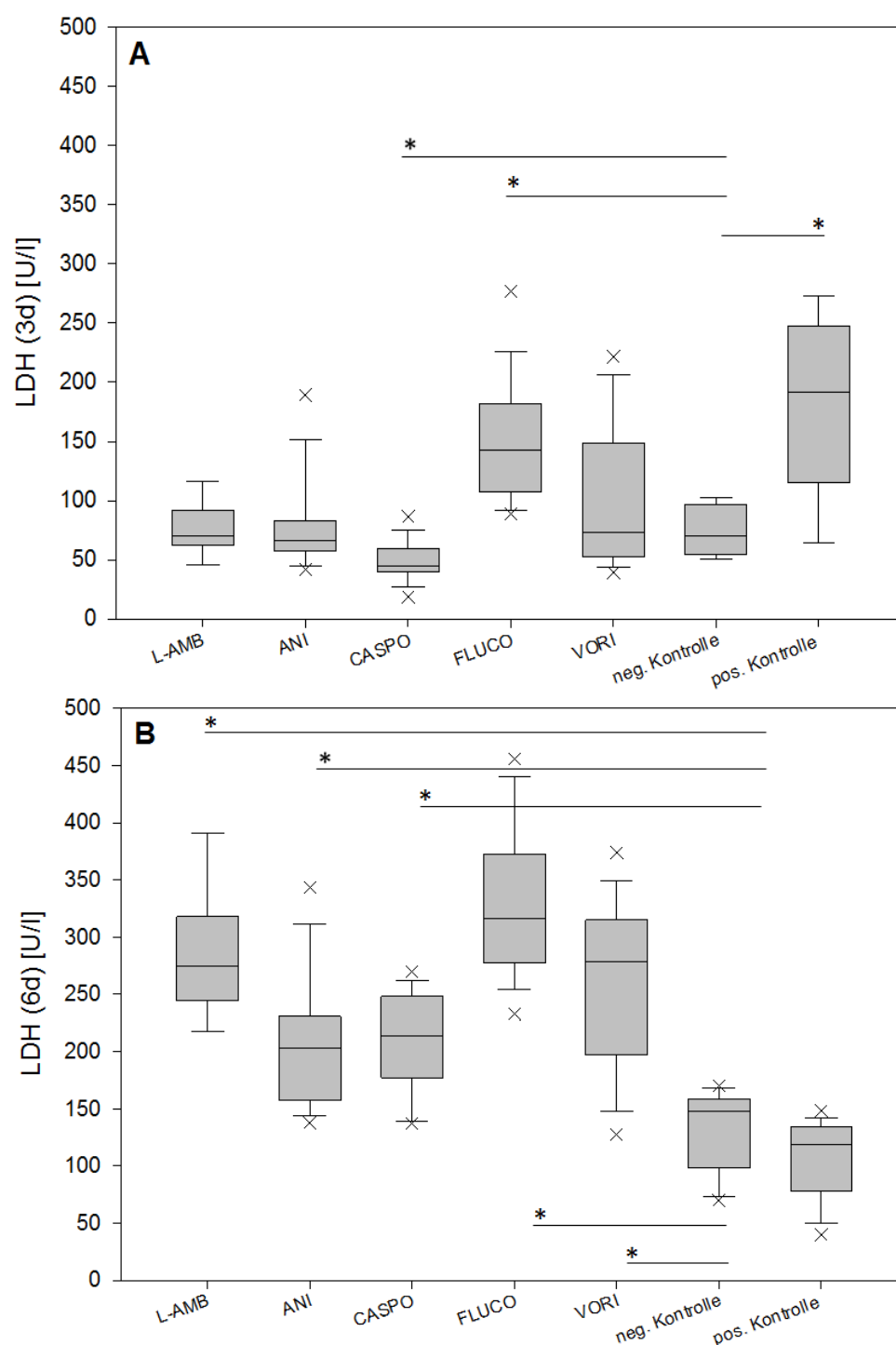


Abb. 11 A| Darstellung der LDH-Werte [U/l] nach 3 Tagen und B| nach 6 Tagen in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (71 U/l) zeigten Fluconazol in der C_{\max} -Konzentration (144 U/l) und die Positivkontrolle Paracetamol (194 U/l) am Tag 3 signifikante Erhöhungen der LDH-Konzentration. Während die Streubreite der Werte von Voriconazol relativ groß war, lag der Median verglichen mit der Negativkontrolle gleich hoch. Bei den anderen Testsubstanzen Liposomales Amphotericin B und Anidulafungin wurden geringe LDH-Werte im Bereich der Negativkontrolle bestimmt. Bei Caspofungin wurde im Gegensatz zu allen anderen nur 46,5 U/l LDH gemessen.

Am Tag 6 waren deutliche Unterschiede in den LDH-Werten zum Tag 3 zu erkennen. Alle Substanzen verzeichneten einen Anstieg in der gemessenen Konzentration. Um das 5-fache und somit am deutlichsten stiegen die Werte bei Caspofungin und Voriconazol. Die LDH-Konzentration von Fluconazol verdoppelte sich und lag mit 316 U/l 115 % über dem Wert der Negativkontrolle. Ähnlich bei Voriconazol mit 279 U/l und Liposomales Amphotericin B mit 271,5 U/l. Aufgrund der starken Schädigung und dem entsprechenden Zellzahlverlust in drei Tagen, wurde bei Paracetamol nur ein LDH-Wert von 119 U/l bestimmt.

Freisetzung von LDH im Medium mit steigender Konzentration

Betrachtet man die einzelnen Testsubstanzen hinsichtlich ihrer Konzentrationszunahme im Testansatz so fällt auf, dass mit zunehmender Konzentration bei allen Testsubstanzen mit Ausnahme von Anidulafungin der LDH-Wert am Tag 3 und Tag 6 gesunken sind. Mit steigender Wirkstoffkonzentration nahm bei Anidulafungin die Zellschädigung am Tag 3 zu und es kam zur signifikanten Erhöhung der LDH-Werte. Mit anfangs 66 U/l stieg der Messwert auf 412 U/l.

Freisetzung von LDH im Plasma

Die LDH-Bestimmung im Plasma ergab ähnliche Trends, wie die Bestimmungen im Medium. Allerdings wurden insgesamt höhere Messwerte bestimmt. Bei der Negativkontrolle wurden 165 U/l bestimmt. Mit steigenden Konzentrationen sanken auch im Plasma die LDH-Werte an Tag 3 und Tag 6. Mit Ausnahme von Anidulafungin, da stieg der LDH-Wert signifikant. Bei der C_{\max} -Konzentration wurden 142 U/l gemessen, während in der zehnfachen C_{\max} -Konzentration 751 U/l bestimmt wurden (siehe Anhang Tab. 28 | 29).

4.2.1.3 Live/Dead Färbung

Live/Dead Färbung der Mediumversuche

In Abb. 12 A ist die Negativkontrolle dargestellt. Zu sehen sind hauptsächlich grün fluoreszierende und flach polygonal wachsende Zellen, die als Monolayer gewachsen sind. Es erscheinen vereinzelt stark grün fluoreszierend Zellhaufen, was für intensive intrazelluläre Verbindungen spricht. Nur vereinzelt sind rot fluoreszierende, avitale Zellen sichtbar.

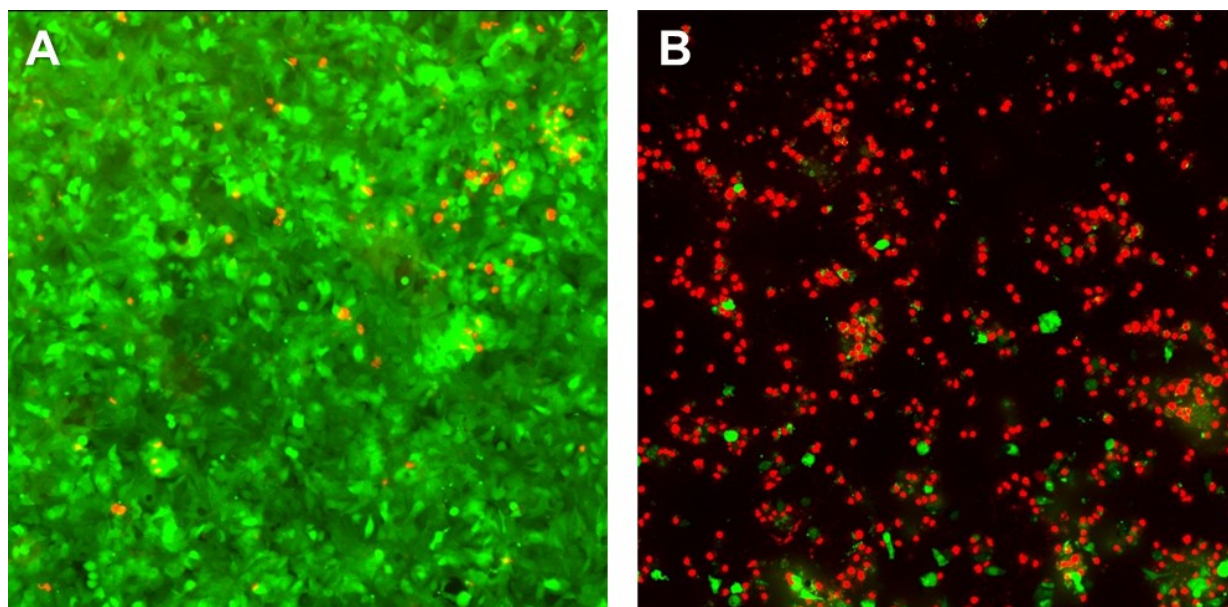


Abb. 12 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100-fach Vergrößerung) der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A mit A| Kulturmedium + 10% FKS (Negativkontrolle) und B| Paracetamol 15,24 mM Medium (Positivkontrolle). Es wurde keine Quantifizierung durchgeführt.

Im Vergleich zu A sind eine deutliche Reduzierung der Zellzahl und eine starke morphologische Zellveränderung in Abb. 12 B (Positivkontrolle) zu erkennen. Es zeigt sich die Zunahme der rot-fluoreszierenden Zellen als Zeichen einer deutlich reduzierten Vitalität. Die Live/Dead-Färbungen zeigte nach Inkubation mit den Antimykotika (C_{\max} -Konzentration, Medium) unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen, welche in Tab. 10 dargestellt sind.

Tab. 10 Zellmorphologie-Beschreibung anhand der Live/Dead-Aufnahmen antimykotikabehandelte Zellen im Medium

Substanz	Abb.	Beschreibung der Zellmorphologie
Liposomales Amphotericin B	13 A	- leichte morphologische Veränderung: Zellverband nicht vollständig, überwiegend vitale Zellen, ein paar avitale Zellen
Anidulafungin	13 B	- morphologische Veränderung: Zellverband aufgelöst, beginnende vakuolisierte vitale Zellen, vereinzelt avitale Zellen
Caspofungin	13 C	- kaum morphologische Veränderung: dichter Zellverband mit überwiegend vitalen Zellen und avitale Zellen - stark fluoreszierende Stellen = intensive intrazelluläre Verbindungen bzw. Zellen, die über den Monolayer hinausgewachsen sind
Fluconazol	13 D	- morphologische Veränderung: spindel- und fibroblastenartige vitale Zellen, Zellverband nicht durchgängig geschlossen, avitale Zellen reichlich verstreut über dem Zellverband
Voriconazol	ohne Abb.	- morphologische Veränderungen: spindelartige vitale Zellen, Zellverband nicht vollständig geschlossen, überwiegend avitale Zellen

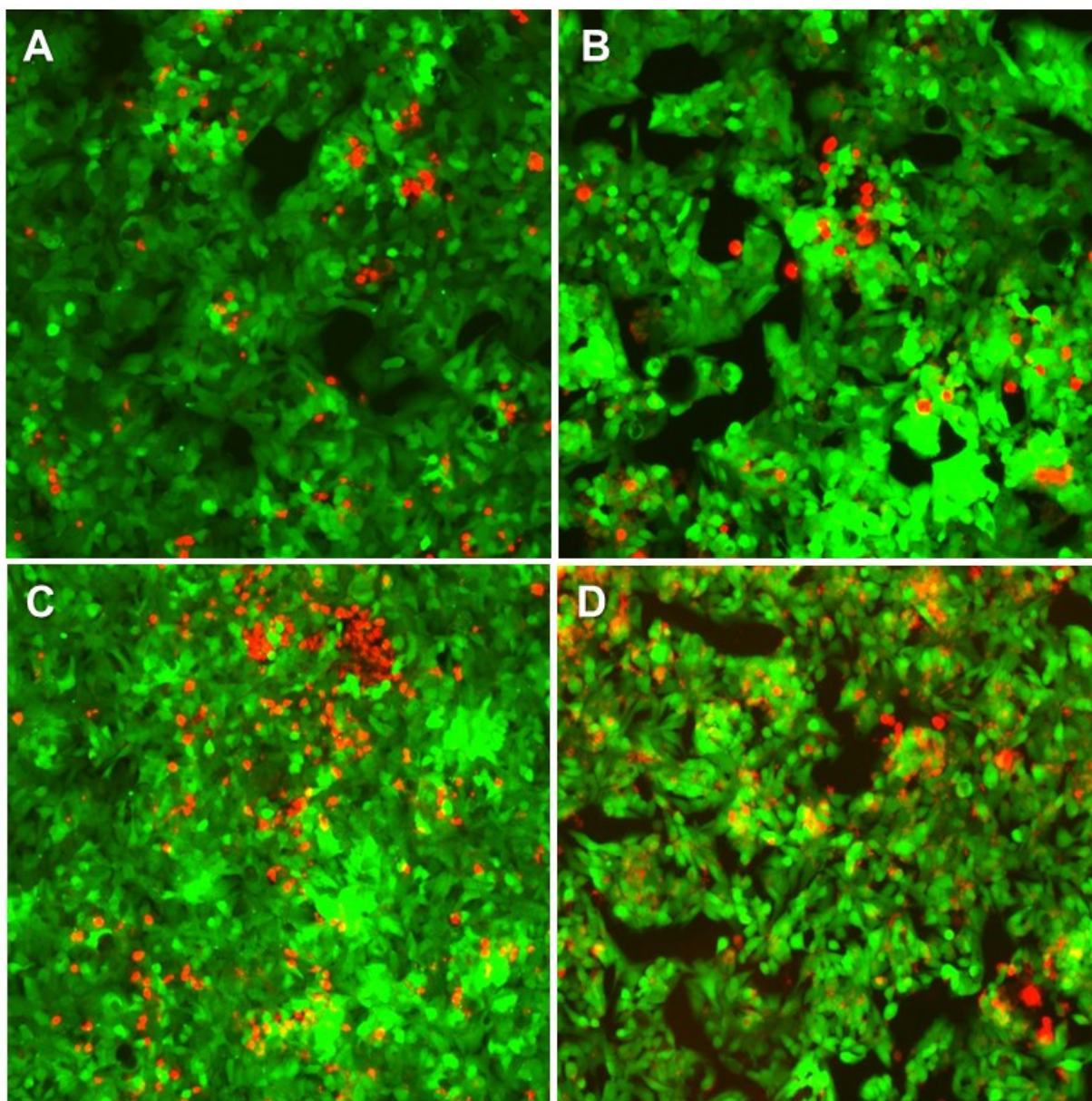


Abb. 13 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100-fach Vergrößerung) der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A in der C_{max} -Konzentration im Medium mit A| 5,7 mM Liposomales Amphotericin B B| 2,25 mM Anidulafungin C| 0,2 mM Caspofungin und D| 4,5 mM Fluconazol. Es wurde keine Quantifizierung durchgeführt.

Live/Dead Färbung der Mediumversuche mit steigender Konzentration

Konzentrationsabhängige Beeinträchtigungen der Zellmorphologie wurden vorwiegend bei Anidulafungin und Liposomales Amphotericin B gesehen. Die Erhöhung der Anidulafungin-Konzentration führte zur starken Reduzierung der Anzahl vitaler Zellen und zur deutlichen Veränderung der Zellmorphologie. In Abb. 14 C ist kein Zellverband mehr zu erkennen und bei den noch vitalen Zellen ist die polygonale Form aufgelöst und die Zellen waren späröiden-förmig. Es ist zur Vakuolisierung des Cytoplasmas, sowie zu einem damit einhergehenden Volumenverlust der Zelle gekommen. Die Zunahme der rot-fluoreszierenden Zellen war ein Zeichen einer deutlichen reduzierten Vitalität der HepG2/C3A. Durch die erhöhte Liposomalen

Amphotericin B-Wirkstoffmenge erschienen die vitalen Zellen vakuolisiert und aufgebläht (Abb. 14 A). Der Zellverband wirkt „löchrig durchlässig“ und reichlich viele avitalen Zellen sind oberhalb vom Zellverband verstreut.

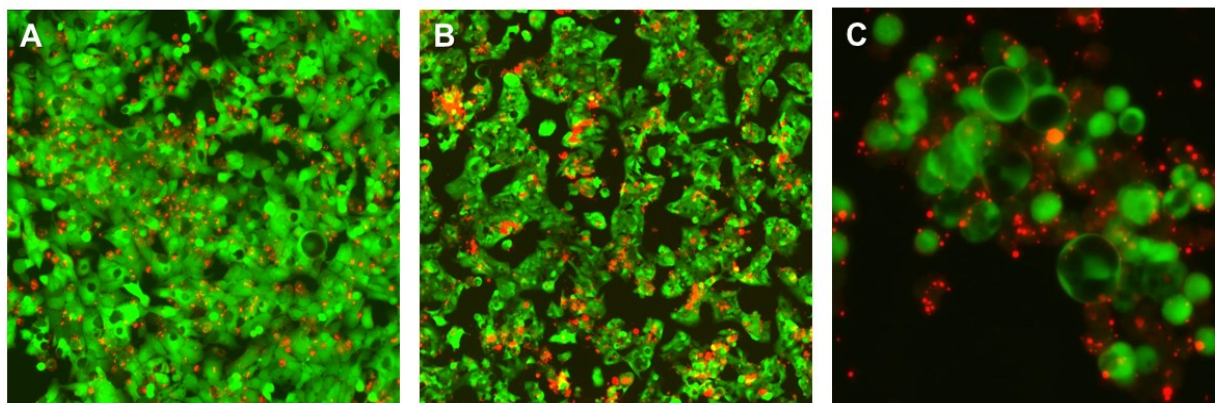


Abb. 14 Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Live/Dead-Färbung nach 6-tägiger Inkubation der HepG2/C3A mit A| Liposomales Amphotericin B, $10 \times C_{\max}$ (57,25 mM), Medium, 40-fach Vergrößerung B| Fluconazol, $10 \times C_{\max}$ (45 mM), Medium, 40-fach Vergrößerung C| Anidulafungin, $5 \times C_{\max}$ (11,25 mM), Medium, 200-fach Vergrößerung. Es wurde keine Quantifizierung durchgeführt.

Bei Caspofungin, Voriconazol und Fluconazol (Abb. 14 B) wurden keine zusätzlichen entscheidenden Beeinträchtigungen der Zellmorphologie beobachtet. Mit zunehmender Konzentration ist lediglich die Anzahl der avitalen Zellen gestiegen.

Live/Dead Färbung der Plasmaversuche

Bei der qualitativen LIVE/DEAD-Analyse der Plasmaversuche wurde deutlich, dass bei Anidulafungin und Liposomales Amphotericin B weniger ausgeprägte konzentrationsabhängige Zellschädigungen hervorgerufen wurden. Beim Liposomalen Amphotericin B war die Ausprägung der vakuolisierten und aufgeblähten vitalen Zellen sichtbar geringer. Anidulafungin-behandelte Zellen im Plasma zeigten bei keiner Konzentration direkte Veränderung der hepatozyten-typischen Zellmorphologie und dass mit zunehmender Konzentration die Anzahl der vitalen Zellen als Kennzeichen einer verringerten Vitalität abgenommen hat. Bei Caspofungin, Voriconazol und Fluconazol waren kaum Unterschiede zwischen der Inkubation mit Medium oder Plasma zu erkennen.

4.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Mit den Rasterelektronenmikroskopischen (REM)-Aufnahmen konnte die Oberflächen der HepG2/C3A hochaufgelöst abgebildet und analysiert werden. In Abb. 15 A ist eine Aufnahme vom Monolayer von der Negativkontrolle zu erkennen, wobei der Zellverband nicht mehr komplett geschlossen ist. In der Abb. 15 B sind Zellen abgebildet, die mit Paracetamol (15,25 mM | Medium) inkubiert wurden. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass kein Monolayer mehr vorhanden ist. Es sind nur noch vereinzelt Zellen in der typischen Hepatozytenmorphologie an der

Unterlage adhärent. Die Zellen sind stark geschädigt. Zum Teil sind nur noch Cytoskelette der Zellen erkennbar.

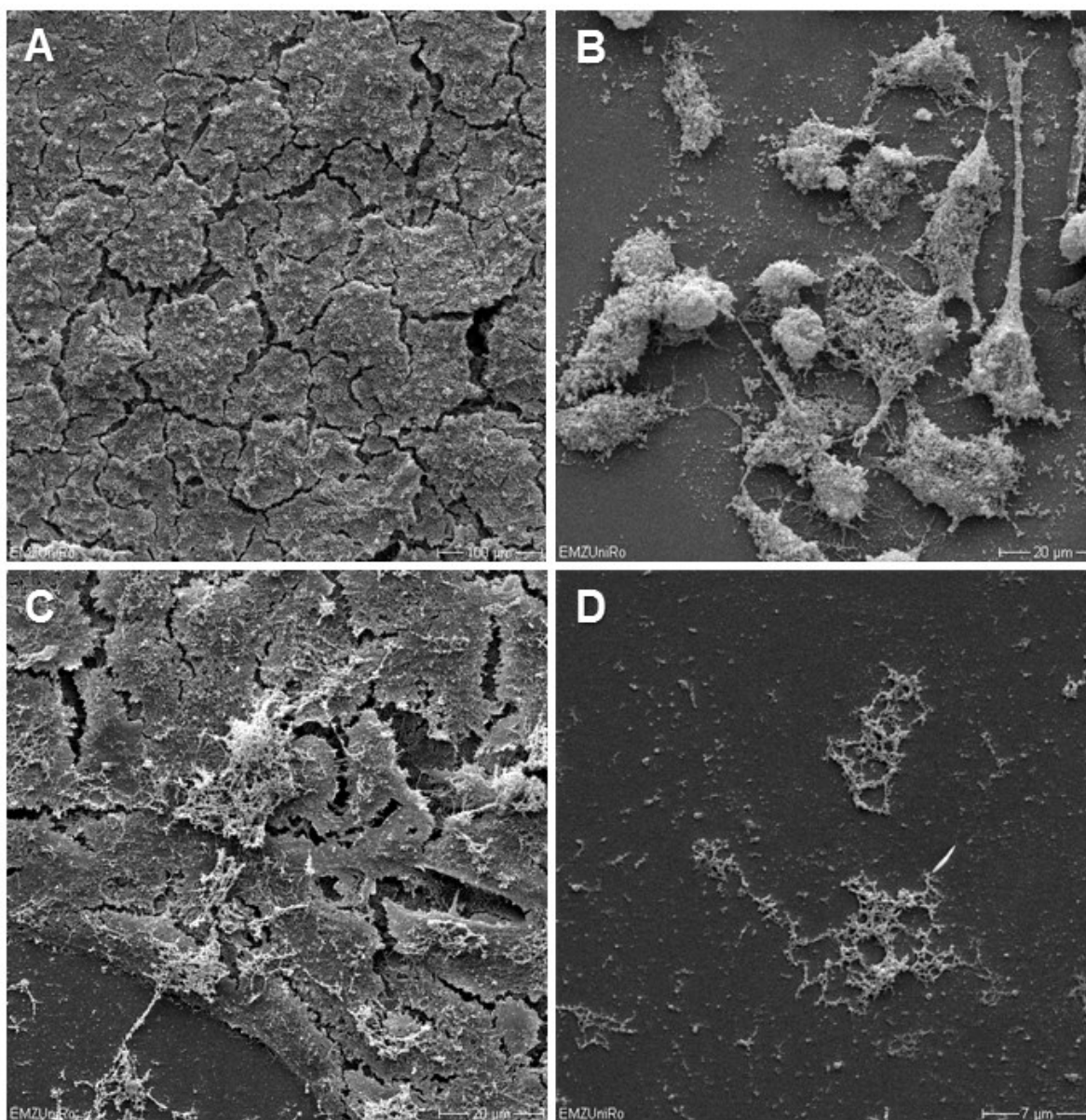


Abb. 15 REM-Aufnahmen von HepG2/C3A - A| Kulturmedium + 10% FKS (Negativkontrolle), 200-fach Vergrößerung B| Paracetamol 15,24 mM im Medium (Positivkontrolle), 1000-fach Vergrößerung C| Caspofungin, C_{\max} (0,2 mM) im Medium, 1000-fach Vergrößerung und D| Anidulafungin, $10 \times C_{\max}$ (22,5 mM), Medium, 3500-fache Vergrößerung. Es wurde keine Quantifizierung durchgeführt.

Bei den mit Antimykotika-behandelten Zellen in der C_{\max} -Konzentration wurden die geringsten Schäden unter Zugabe von Caspofungin (Abb. 15 C) gesehen. Die Aufnahme ähnelt der Negativkontrolle. An einigen Stellen sind Risse im Zellverband zu erkennen. Entsprechende Aufnahmen wurden von Fluconazol gemacht. Bei der Inkubation mit Liposomalen Amphotericin B (ohne Abb.) liegen die Zellen in einem Verband vor. Jedoch gibt es größere Lücken und ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen. Bei Anidulafungin (ohne Abb.) wurde der Zellmonolayer ähnlich geschädigt. Es ist kein zusammenhängender Zellverband zu erkennen.

Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen mit steigender Konzentration

Wurde die Konzentration der Antimykotika gesteigert, konnte bei Caspofungin, Fluconazol und Liposomales Amphotericin B vermehrt Apoptose beobachtet werden. Die Fläche des Monolayer wurde zunehmend reduziert. Gravierende konzentrationsabhängige Beeinträchtigung der Zellmorphologie konnte bei Anidulafungin-inkubierten Zellen beobachtet werden. Es war auffällig, dass Anidulafungin in seiner 10-fachen C_{\max} -Konzentration im Medium ein sehr hohes hepatotoxisches Potenzial besitzt. Es waren kaum noch Zellen auf der Unterlage zu finden. In Abb. 15 D sind nur noch Cytoskelett-Reste der Zellen zu sehen. Der Monolayer wurde fast komplett beschädigt.

4.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Neben den REM-Aufnahmen wurden auch Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen der Zellen erstellt. Alle Strukturen der Zellen, die genügend Kontrast erzeugen (durch Absorption und/oder Streuung von Elektronen), wurden in ein zweidimensionales reales Bild projiziert. Die dargestellten TEM-Bilder (Abb. 16 A/B und 16 A/B) zeigen einen Querschnitt durch einen unbeschädigten HepG2/C3A-Zellmonolayer der Negativkontrolle. Es wurden keine Aufnahmen von Antimykotika-behandelten Zellen angefertigt. Alle wichtigen Strukturen für Hepatozyten wurden in den Aufnahmen erkannt.

In Abb. 16 A ist ein Ausschnitt von sieben Hepatozyten dargestellt. Die Zellkerne (Z) sind rund und beinhalten ein oder zwei Nukleolen (N). Das Cytoplasma (C) der HepG2/C3A enthält bis zu 2000 Mitochondrien (M). Im Bild 17 B ist eine Zelle bei einer 3500-fachen Vergrößerung gezeigt. Zu sehen sind die zahlreichen Mikrovilli (M) zur Oberflächenvergrößerung auf der Zellmembran. Des Weiteren sitzen Glykosylierungsreste auf der Außenseite der Zellmembran (Glykokalyx, G), wobei periphere Proteine und Fortsätze von integralen Proteinen enthalten sind. Eine Basalmembran fehlt bei den HepG2/C3A. Vakuolen (V) kommen vereinzelt auch in ungeschädigten Leberzellen vor. In den abgebildeten TEM-Aufnahmen (Abb. 16 B) wurden nur wenige Vakuolen gefunden. Es handelt sich um rundliche, elektronenoptisch Leere, zum Teil von Membranen umgebenen Strukturen. Die Versikel erscheinen in TEM-Aufnahmen weiß.

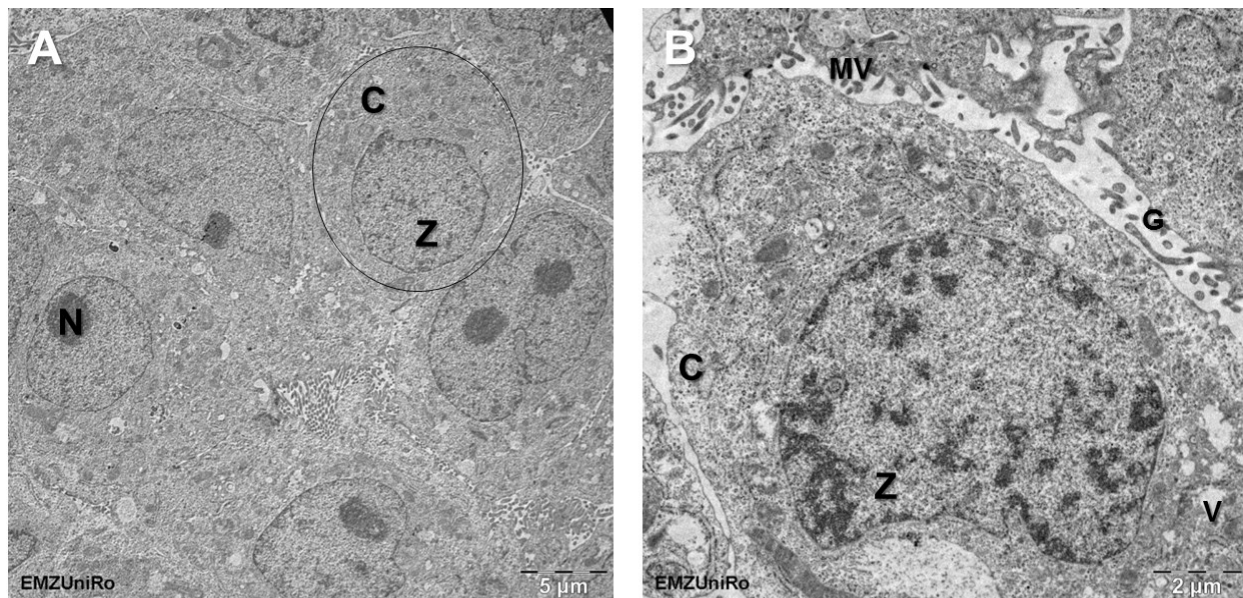


Abb. 16 TEM-Aufnahmen A| eines HepG2/C3A-Monolayer, 1400-fache Vergrößerung und B| einer Zelle, 3500-fach Vergrößerung.

In der Abb. 17 A konnten die Zellorganellen neben Mitochondrien, Ribosomen und raues endoplasmatisches Retikulum in einer Vergrößerung von 1:14000 detaillierter betrachtet werden. Als weitere gut zu erkennende Struktur ist das raue endoplasmatische Retikulum (RER) zu nennen. Das RER besteht aus einem System aus Cytomembranen. An der cytoplasmatischen Seite der Membran befinden sich die Ribosomen (R). Ferner erkennt man in den dargestellten TEM-Aufnahmen Lysosomen (L). In der Abb. 17 B konnte ein Zell- Zellkontakte (Gap-Junction, GJ) in einer Vergrößerung von 32000 gut sichtbar dargestellt werden.

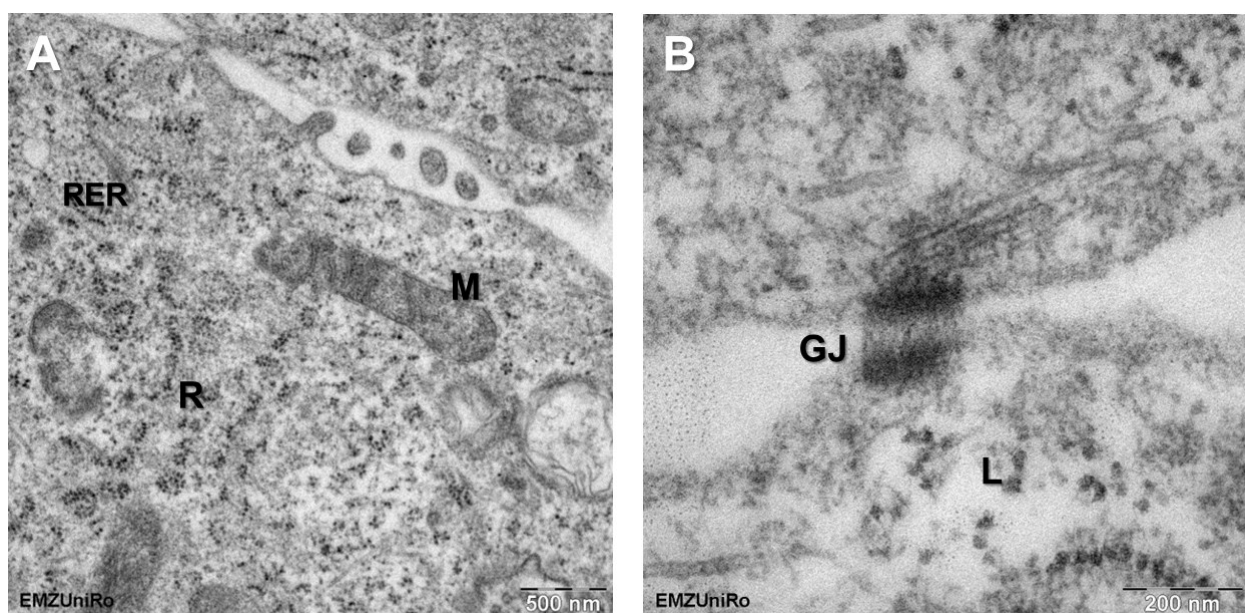


Abb. 17 TEM-Aufnahmen eines Hepatozyten A| 14000-fach Vergrößerung und B| 32000-fach Vergrößerung.

4.2.4 Live Cell Imager

In der kinetischen Verlaufsbeobachtung der Proliferation und Zellmorphologie eines Wells einer 24-Well-Platte im Brutschrank konnten die Auswirkungen der Antimykotika als Video oder als Bilddateien über definierte Zeiträume festgehalten werden. In Abb. 18 (A-C) sind Aufnahmen der Negativkontrolle dargestellt. Es wurde eine Zunahme der Hepatozyten zu einem geschlossenen Monolayer und drüber hinaus beobachtet. Bei den Antimykotika-Versuchen zeigten Fluconazol und Voriconazol in allen Testkonzentrationen erste Beeinträchtigungen der Zellen nach 24 h, während bei Caspofungin und Liposomales Amphotericin B kaum Veränderungen beobachtet werden konnten. Durch die Inkubation mit Anidulafungin (Abb. 18 (D-F)) konnten starke antiproliferierende Effekte auf die Zellen in der höchsten Konzentration im Medium gezeigt werden. Die Ausbildung eines zusammenhängenden Zellmonolayers (Abb. 18 E, F) wurde gestört. Die Zellen lösten sich von dem Wellboden, schrumpften zusammen und lagen verklumpt im Medium vor.

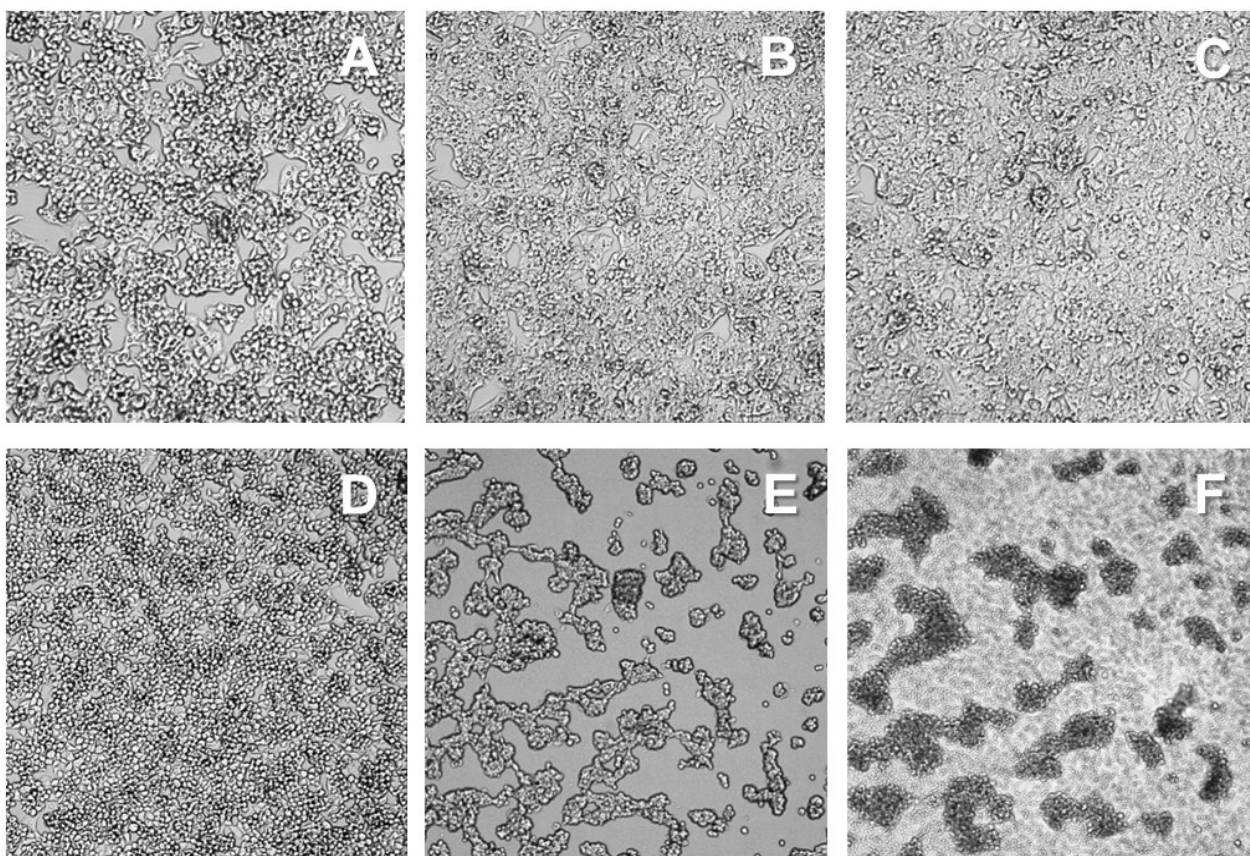


Abb. 18 Darstellung einer 24 h Verlaufsbeobachtung von einem Well einer 24-Well mit 500.000 Zellen. (A-C) Inkubation mit 10 % Kulturmedium, A| Beginn nach 4 h Adhärenz der HepG2/C3A, B| Aufnahme nach 12 h, C| Aufnahme nach 24 h | (D-F) Inkubation mit 10-facher C_{\max} -Konzentration (22,5 mM) von Anidulafungin in 10 % Kulturmedium, D| Beginn nach 4 h Adhärenz, E| Aufnahme nach 12 h, F| Aufnahme nach 24 h | 40-fach Vergrößerung

Zusätzlich konnte die Adhärenz in einem definierten Bereich bestimmt werden. In Abb. 19 sind die Bereiche durch grüne Linien markiert, die zur Adhärenz-Bestimmung als Grundlage verwendet wurden. In Abb. 19 A ist die Negativkontrolle dargestellt. Mit einer Adhärenz von 98,4 % ist nach 24 h der Monolayer nach Zellaussaat fast komplett geschlossen. Durch die Inkubation mit Paracetamol (15,24 mM) im Medium (Abb. 19 B) wurde die Beeinflussung auf die Zellen mit einer Adhärenz von 76,8 % deutlich. Es war kein Monolayer mehr zu erkennen, die Zellen schrumpften und akkumulierten zu Zellhaufen. In Abb. 19 C konnte nach 24 h eine Adhärenz von 84,7 % von Fluconazol-behandelten (C_{\max} -Konzentration im Medium) bestimmt werden. Es sind einige Lücken im Monolayer zu erkennen. Ähnliche Aufnahmen zeigte Voriconazol. Beim Liposomalen Amphotericin B, Anidulafungin und Caspofungin wurden geringe Beeinträchtigungen mit einer entsprechenden Adhärenz im Durchschnitt von 90 % beobachtet.

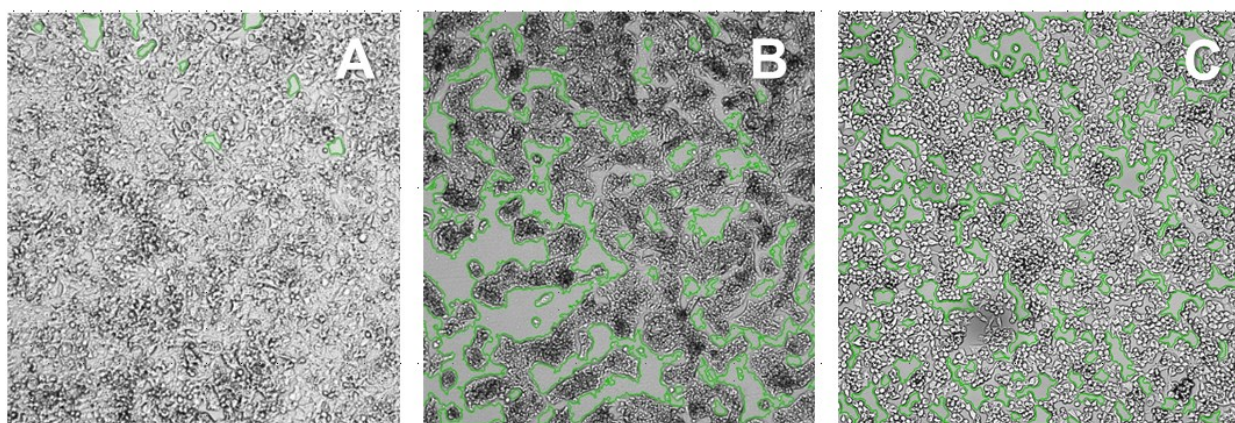


Abb. 19 Darstellung der Adhärenzbestimmung von A| der Negativkontrolle, B| von Paracetamol, (15,24 mM, Medium), C| von Fluconazol, (4,5 mM C_{\max} -Konzentration, Medium) | nach 24 h, 500.000 Zellen

4.2.5 Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin

Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin im Medium

Die Detektierung von Mikroalbumin im Zellkulturüberstand der Negativkontrolle ergab im Mittel 7 mg/l. Dagegen wurde bei der Positivkontrolle kein Mikroalbumin von den Zellen gebildet. Die Abb. 20 zeigt die Verteilung von Mikroalbumin nach Zugabe der Antimykotika in den C_{\max} -Konzentrationen. Signifikant erhöhte Werte wurden nach Inkubation mit Anidulafungin, Liposomales Amphotericin B und Fluconazol gefunden. Caspofungin und Voriconazol zeigten keine Auffälligkeiten im Vergleich zur Negativkontrolle.

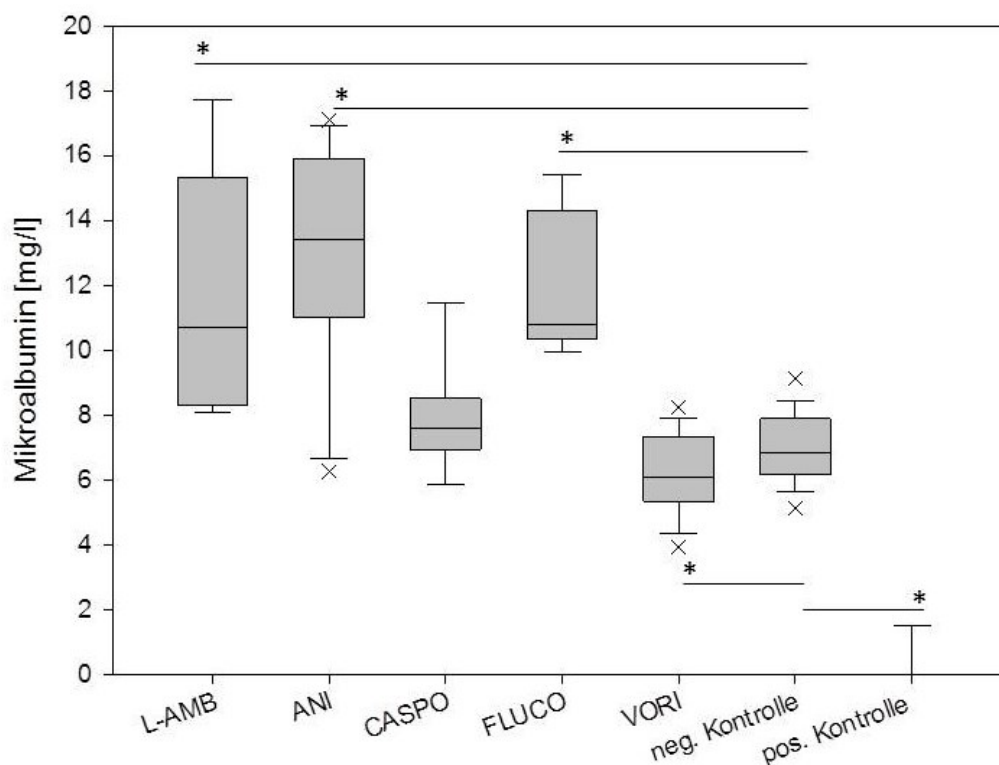


Abb. 20 Darstellung von Mikroalbumin [mg/l] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin im Medium mit steigender Konzentration

Bei der Testung zunehmender Konzentration der Antimykotika zeigte sich bei Anidulafungin, dass die Mikroalbuminsynthese stark beeinträchtigt wurde (Abb. 21 A). Bei Caspofungin (7,6-6,8) und Voriconazol (6,1-6,6) blieben die Werte mit Erhöhung der Konzentration relativ konstant. Anders bei Liposomales Amphotericin B, da wurden signifikant höhere Mikro-albuminwerte bei 5-facher- und 10-facher- C_{\max} Konzentration ermittelt (Abb. 21 B). Bei Fluconazol wurden anfänglich 10,8 mg/l Mikroalbumin detektiert, anschließend sanken die Werte signifikant mit zunehmender Konzentration auf 5,5 mg/l bei 5x C_{\max} und auf 6,7 mg/l bei 10x C_{\max} .

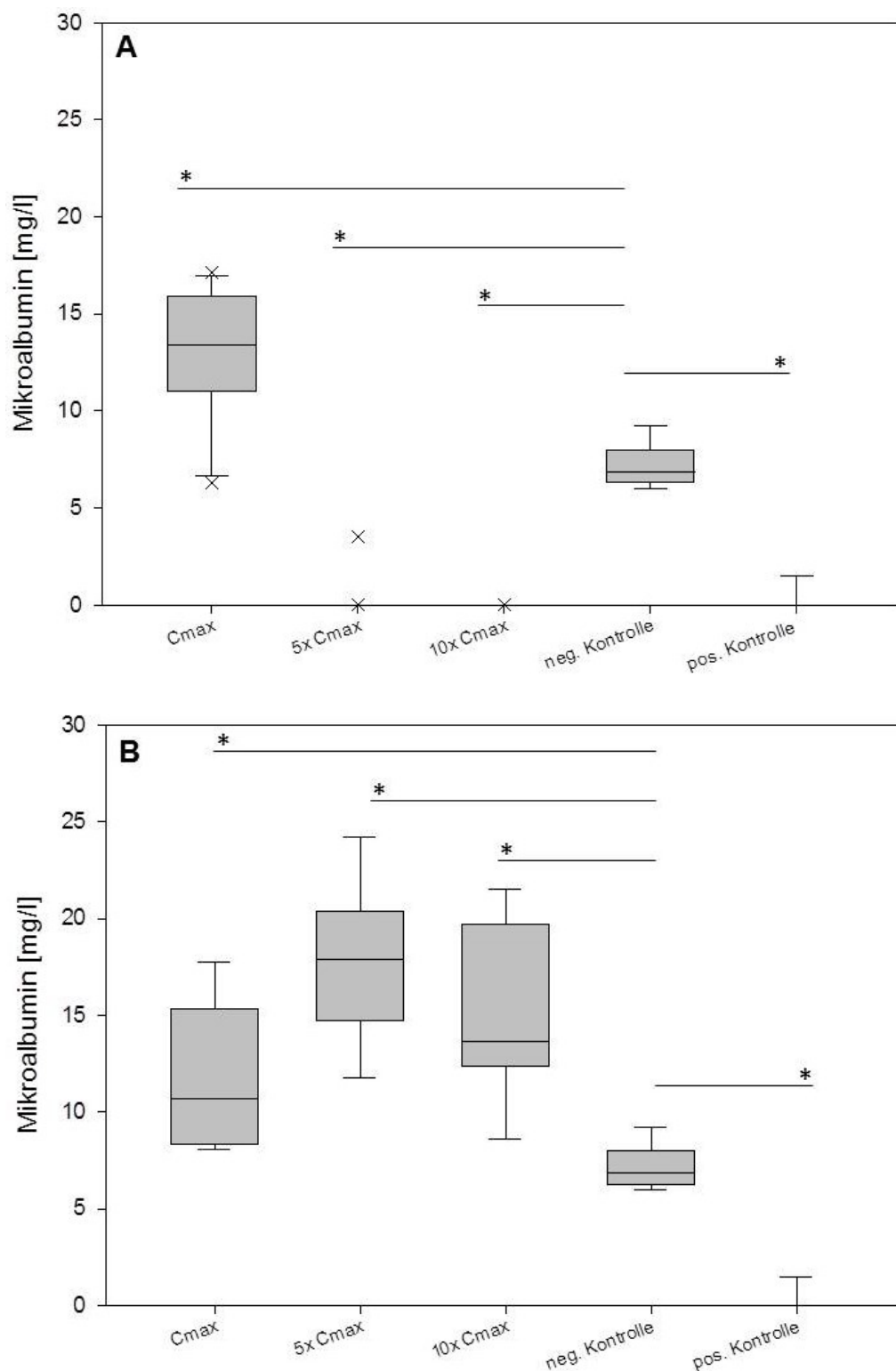


Abb. 21 Darstellung von Mikroalbumin [mg/l] von A) Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B) vom Liposomalen Amphotericin B (5,7 mM, 28,62 mM, 57,25 mM). Es sind C_{max}, 5x C_{max}, 10x C_{max}-Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin im Plasma

Bei der Mikroalbuminbestimmung im Plasma waren die Messwerte deutlich höher als bei den Mediumversuchen. Die Konzentrationen an Mikroalbumin waren mit 5,5 mg/l bei der Positivkontrolle und mit 13,7 mg/l der Negativkontrolle gering. Von den getesteten Antimykotika in der C_{\max} -Konzentration sind Liposomales Amphotericin B mit 26 mg/l und Caspofungin mit 29,5 mg/l auffällig niedrig. Im Vergleich dazu wurden bei Anidulafungin (496 mg/l), Fluconazol (600 mg/l) und Voriconazol (498 mg/l) sehr hohe Mikroalbuminwerte im Durchschnitt gemessen. Die Messwerte der Testung streuten stark, demnach ist eine hohe Spannweite der einzelnen Wirkstoffe aufgetreten.

Bestimmung der Proteinsynthese von Mikroalbumin im Plasma mit steigender Konzentration

Mit Zunahme der Wirkstoffmenge nahmen die Mikroalbuminwerte ab, dabei sanken die Werte von Anidulafungin auf 459 mg/l, bei Voriconazol auf 454 mg/l und bei Caspofungin auf 24,8 mg/l in der 10-fachen C_{\max} -Konzentration. Lediglich beim Liposomalen Amphotericin B (27,9 mg/l) und bei Fluconazol (604 mg/l) konnte eine leichte Erhöhung ermittelt werden. (siehe Anhang Tab. 31)

4.2.6 Aktivität von Enzymsystemen

4.2.6.1 Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP1A2-Aktivität

CYP1A2-Aktivität im Medium

Der EROD-Test basiert auf einer enzymkatalytischen Dealkylierung von Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin (vgl. Kapitel 3.4.3.1) durch CYP1A2. In der Abb. 22 wird deutlich, dass Liposomales Amphotericin B in der C_{\max} -Konzentration und die Positivkontrolle eine signifikante Erhöhung der Resorufinmenge im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen. Bei der Negativkontrolle wurden im Durchschnitt 3 pmol/l Ethoxyresorufin zu Resorufin umgesetzt. Bei Fluconazol und Voriconazol wurden signifikant geringere CYP-Aktivitäten gemessen.

CYP1A2-Aktivität im Medium mit steigender Konzentration

Die Konzentrationssteigerung der Wirkstoffe bewirkte eine nicht signifikante Reduzierung der Resorufinwerte bei Anidulafungin (2,54-2,18 pmol/l), bei Caspofungin (2,49-2,43 pmol/l), bei Fluconazol (1,97-1,86 pmol/l) und bei Voriconazol (2,00-1,89 pmol/l). Nur beim Liposomalen Amphotericin B ist der Ausgangswert von 6,38 pmol/l auf 6,48 pmol/l gestiegen, aber nicht signifikant.

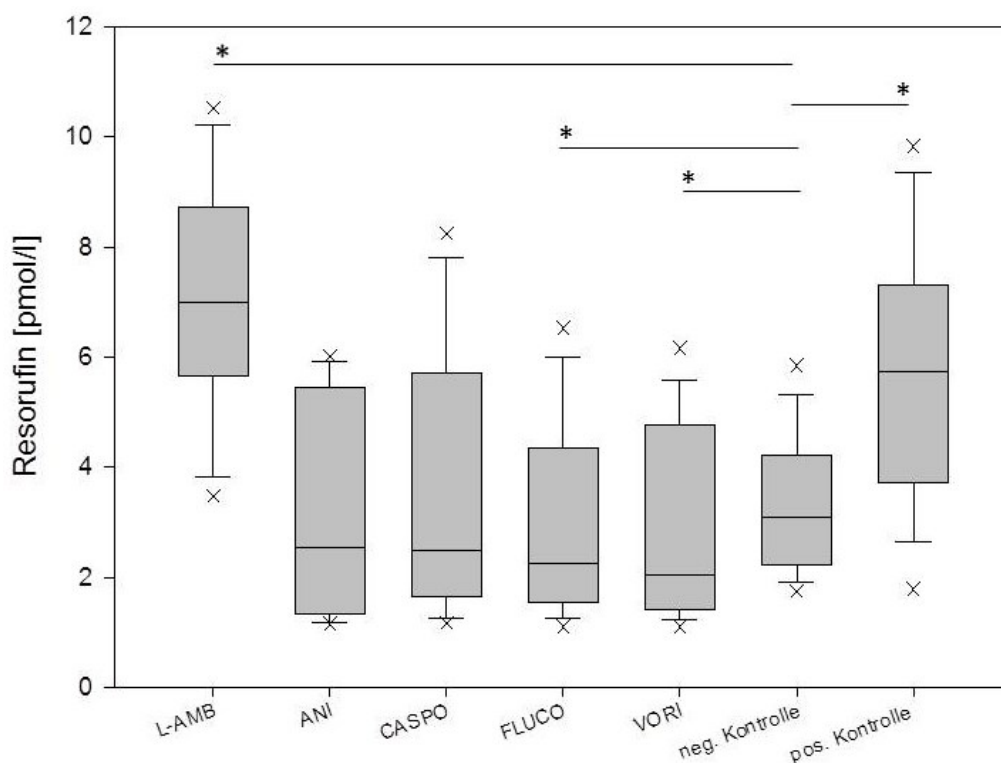


Abb. 22 Darstellung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin [pmol/l]) in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

CYP1A2-Aktivität im Plasma

Im Plasma wurde beim Liposomalen Amphotericin B (5,94 pmol/l) und Voriconazol (5,43 pmol/l) die höchste CYP1A2-Aktivität in der C_{\max} -Konzentration bestimmt. Folgend von der Positivkontrolle (3,72 pmol/l) und der Negativkontrolle (3,45 pmol/l). Die Konzentrationen von Caspofungin und Anidulafungin lagen bei etwa 2,4 pmol/l. Der geringste Umsatz wurde bei Fluconazol mit 1,53 pmol/l festgestellt. Durch den Konzentrationsanstieg der Testsubstanzen kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme der Ethoxyresorufin-Umsetzung bei allen Antimykotika, außer bei Voriconazol. Nach anfangs 5,43 pmol/l wurden bei der 10-fachen C_{\max} -Konzentration nur noch 5,30 pmol/l analysiert. (siehe Anhang Tab. 37)

4.2.6.2 Fluorimetrische Bestimmung P450 / CYP3A4-Aktivität

CYP3A4-Aktivität im Medium

Die Aktivitätsunterschiede zwischen den drei getesteten Substanzen in der C_{\max} -Konzentration waren minimal. Alle drei Wirkstoffe zeigten jedoch eine höhere Aktivität als die Negativkontrolle mit 3,9 pmol/l. Die Werte von Caspofungin (4,1 pmol/l), Fluconazol (4,4 pmol/l) und Anidulafungin (4,6 pmol/l) lagen aber noch unterhalb des Wertes der Positivkontrolle (4,7 pmol/l).

CYP3A4-Aktivität im Medium mit steigender Konzentration

Die CYP3A4-Konzentration wurde auch bei Steigerung der Wirkstoffmenge (C_{\max} , $5 \times C_{\max}$, $10 \times C_{\max}$) gemessen. Die Werte bei Anidulafungin (Abb. 23 A) stiegen signifikant im Vergleich zu C_{\max} auf 19,88 pmol/l an. Dagegen war kein signifikanter Einfluss der Wirkstoffmenge auf den Aktivitätsparameter CYP3A4 bei Caspofungin zu verzeichnen. Alle Werte lagen bei etwa 4 pmol/l. Bei Fluconazol konnte eine leichte nicht signifikante Zunahme der Aktivität verzeichnet werden. (siehe Anhang Tab. 38)

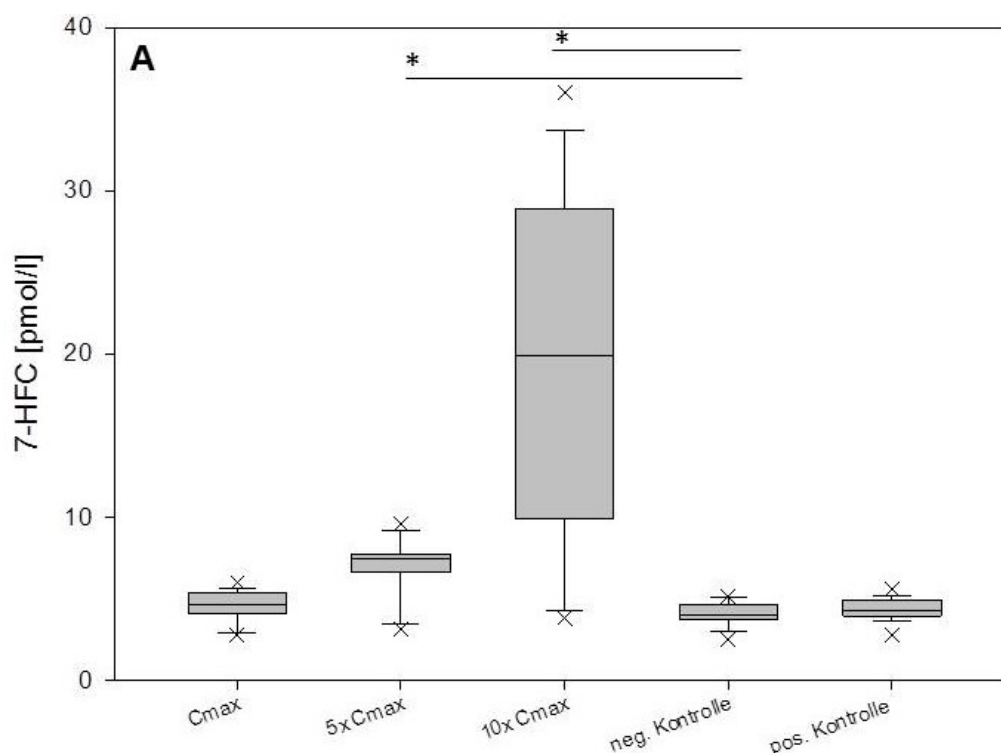


Abb. 23 Darstellung der Umsetzung von 7-BFC zu 7-HFC [pmol/l] von A) Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B) Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM). Es sind C_{\max} , $5 \times C_{\max}$, $10 \times C_{\max}$ -Konzentration im Medium, sowie eine neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

CYP3A4-Aktivität im Plasma

Bei der fluorimetrische Bestimmung der CYP3A4 Aktivität der Antimykotika im Plasma wurden im Vergleich zu den Mediumansätzen höhere Messwerte bestimmt. Der 7-HFC Wert der Positivkontrolle lag mit 5,7 pmol/l am höchsten, folgend von Anidulafungin mit 5,3 pmol/l und abschließend mit der Negativkontrolle mit 4,8 pmol/l. Dazwischen befinden sich Caspofungin mit 5,1 pmol/l und Fluconazol mit 5,0 pmol/l.

CYP3A4-Aktivität im Plasma mit steigender Konzentration

Auch im Plasma zeigte eine Erhöhung der Wirkstoffmenge von Anidulafungin eine signifikante Zunahme der Umsetzung von 7-BFC zu 7-HFC. Dabei wurden bei der 10-fachen C_{\max} -Konzentration 11,1 pmol/l 7-HFC bestimmt. Bei Caspofungin (5,1-4,5 pmol/l) und bei Fluconazol (5,0-4,6 pmol/l) kam es zur nicht signifikanten Verminderung der Ausgangswerte. (siehe Anhang Tab. 39)

4.2.7 Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) - indirekt

XTT-Test - indirekt im Medium

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der HepG2/C3A wurde der XTT-Assay in zwei unterschiedliche Varianten verwendet. Bei der indirekten Bestimmung (Messung der Zellen im Zellkulturüberstand) betrug die Extinktion/Well der Negativkontrolle 0,98. Bei den getesteten Antimykotika in der C_{\max} -Konzentration lagen Liposomales Amphotericin B, Caspofungin und Fluconazol im Bereich der Negativkontrolle (Tab. 11, Spalte MEDIUM). Anidulafungin mit 0,69 und Voriconazol mit 0,75 lagen signifikant unterhalb der Negativkontrolle.

Tab. 11 Messwerte der indirekten XTT-Bestimmung [Extinktion/Well] im Medium und Plasma der verwendeten Antimykotika, sowie neg. + pos. Kontrolle | Median, 25/75 Perzentil, *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle

Testsubstanz	Parameter	XTT indirekt [Extinktion], MEDIUM			XTT indirekt [Extinktion], PLASMA		
		verwendete Konzentrationen			verwendete Konzentrationen		
		C_{\max}	5x C_{\max}	10x C_{\max}	C_{\max}	5x C_{\max}	10x C_{\max}
Liposomales Amphotericin B (5,72 mM 28,63 mM 57,25 mM)		0,83 *	0,79 *	0,97	0,78 *	0,83	0,97
		0,74 / 0,97	0,70 / 1,01	0,73 / 1,20	0,72 / 0,97	0,72 / 1,14	0,77 / 1,47
Anidulafungin (2,25 mM 11,25 mM 22,50 mM)		0,69 *	0,60 *	0,62 *	0,70 *	0,66 *	0,65 *
		0,65 / 0,81	0,56 / 0,64	0,59 / 0,66	0,67 / 0,82	0,59 / 0,72	0,57 / 0,68
Caspofungin (0,2 mM 1,0 mM 2,0 mM)		0,93	0,75 *	0,77 *	0,78 *	0,83	0,86 *
		0,73 / 1,16	0,69 / 1,02	0,70 / 1,10	0,72 / 0,93	0,64 / 1,16	0,72 / 1,11
Fluconazol (4,5 mM 22,5 mM 45,0 mM)		0,88	0,72 *	0,71 *	0,80 *	0,74 *	0,82 *
		0,84 / 1,02	0,68 / 0,80	0,68 / 0,77	0,73 / 0,87	0,68 / 0,83	0,75 / 0,98
Voriconazol (0,25 mM 1,25 mM 2,5 mM)		0,75 *	0,67 *	0,60 *	0,79 *	0,72 *	0,68 *
		0,70 / 0,84	0,62 / 0,72	0,55 / 0,68	0,72 / 1,01	0,66 / 0,84	0,64 / 0,80
neg. Kontrolle		0,98			1,01		
		0,81 / 1,12			0,79 / 1,21		
pos. Kontrolle		1,26 *			1,26 *		
		1,19 / 1,35			1,15 / 1,36		

XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide),

XTT-Test - indirekt im Medium mit steigender Konzentration

Durch die Erhöhung der Wirkstoffmenge konnte bei Caspofungin, Fluconazol und bei Voriconazol eine signifikante Abnahme der Zellviabilität bestimmt werden. Bei Anidulafungin konnte nur eine leichte Abnahme beobachtet werden. Liposomales Amphotericin B stellt in diesem Zusammenhang die Ausnahme da, mit einer anfänglichen Extinktion/Well von 0,83 stieg die mitochondriale Aktivität auf eine Extinktion/Well von 0,97. (Tab.11)

XTT-Test - indirekt im Plasma

Bei der Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Plasma betrug die Extinktion/Well der Negativkontrolle 0,79. Alle Antimykotika lagen im Bereich der Negativkontrolle (Tab. 11, Spalte PLASMA). Im Vergleich untereinander waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Positive konzentrationsabhängige Beeinflussungen wurden beim Liposomalen Amphotericin B, Caspofungin und Fluconazol gesehen. Die Ausgangswerte sind mit zunehmender Konzentration gestiegen. Negative konzentrationsabhängige Beeinflussungen zeigten Anidulafungin und Voriconazol. Es kam zum Verlust der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. (siehe Anhang Tab. 33)

4.2.8 Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) - direkt

XTT-Test - direkt im Medium

Bei der direkten Bestimmung des XTT-Assays (Messung der adhärenenten Zellen) wurde eine Extinktion/Well von 1,51 bei der Negativkontrolle ermittelt. In Abb. 24 ist zu erkennen, dass bei Anidulafungin (1,21), Fluconazol (1,41) und Voriconazol (1,31) die höchste Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen bestimmt wurde. Eine starke signifikante Beeinträchtigung wurde beim Liposomalen Amphotericin B mit 0,78 und bei Caspofungin mit 0,84 bestimmt. Die Inkubation mit der Positivkontrolle führte zu einem starken Verlust der Zellviabilität (0,22).

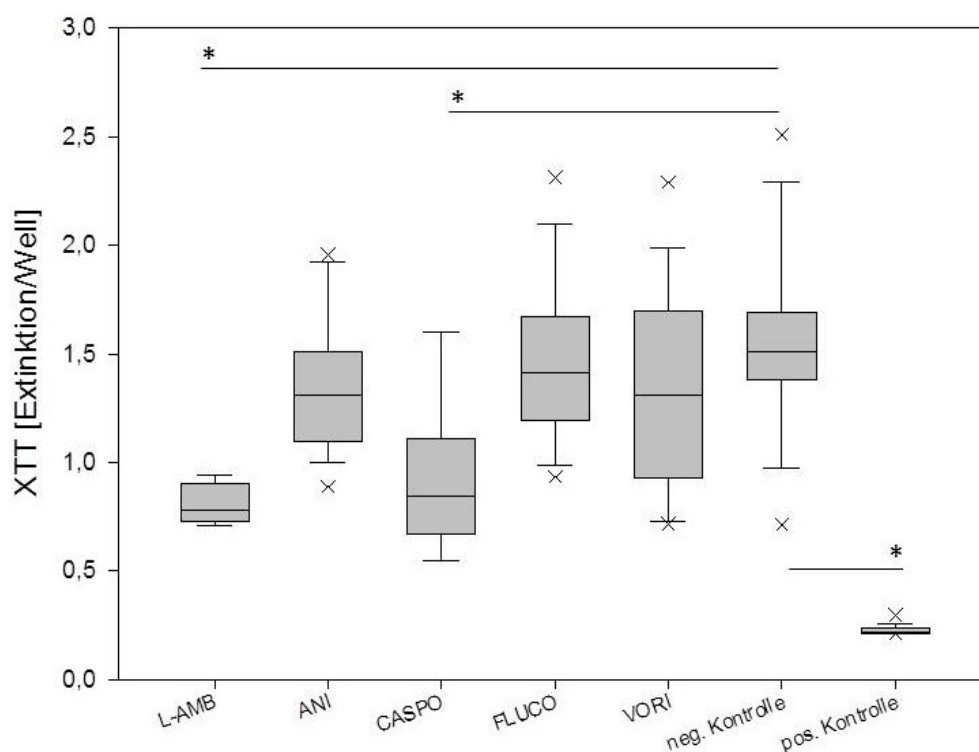


Abb. 24 Darstellung von XTT-direkt, [Extinktion/Well] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol) und 0,25 mM VORI (Voriconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

XTT-Test - direkt im Medium mit steigender Konzentration

Mit steigender Konzentration von Anidulafungin wurden deutlich negative Beeinflussungen auf die Zellviabilität beobachtet (Abb. 25 A). Lagen die Messwerte bei C_{\max} noch bei 1,21, fielen diese beim 5-fachen von C_{\max} auf 0,18 und beim 10-fachen C_{\max} auf 0,15. Geringe, nicht signifikante Effekte auf die Lebens- und Metabolismusfähigkeit der Zellen zeigte Voriconazol. Während beim Liposomalen Amphotericin B (Abb. 25 B) konzentrationsabhängige signifikante Erhöhungen der Ausgangswerte (0,78-1,46) bestimmt wurden, wurden keine signifikanten Zunahmen bei Fluconazol (1,41-1,8) und Caspofungin (0,85-0,94) ermittelt.

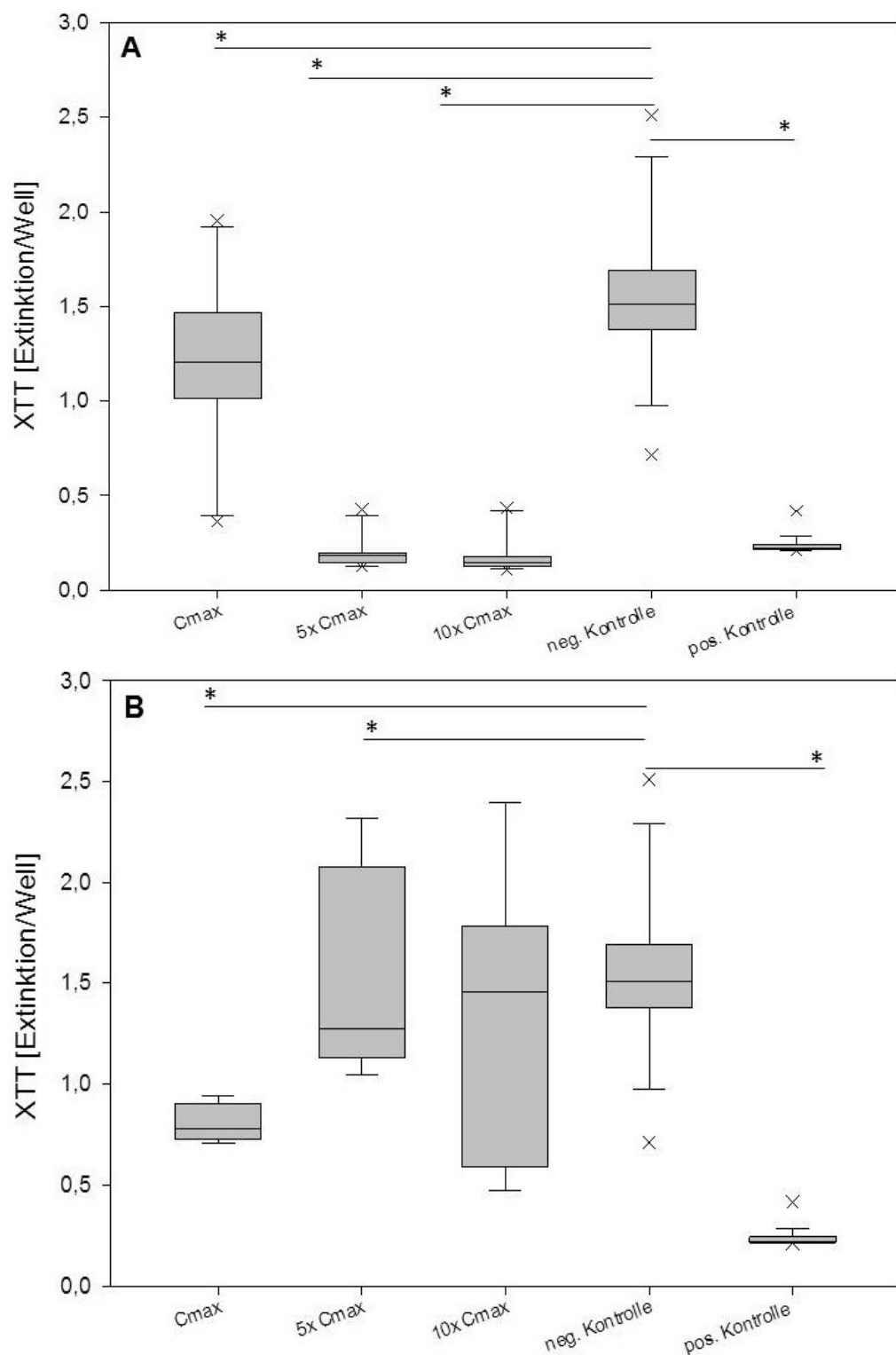


Abb. 25 Darstellung von XTT-direkt [Extinktion/Well] von A| Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) und B| vom Liposomalen Amphotericin B (5,7 mM, 28,62 mM, 57,25 mM). Es sind C_{max}, 5x C_{max}, 10x C_{max}-Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

XTT-Test - direkt im Plasma

Durch die direkte Bestimmung der Mitochondrienaktivität der Testsubstanzen im Plasma in den C_{\max} -Konzentrationen wurden im Vergleich zu den Mediumversuchen insgesamt höhere Aktivitäten ermittelt. Dabei wurde die höchste metabolische Aktivität bei Fluconazol mit einer Extinktion/Well von 1,52 bestimmt. Folgend vom Liposomalen Amphotericin B (1,46), Anidulafungin (1,47) und Caspofungin (1,21). Die niedrigste XTT-Bestimmung wurde bei Voriconazol mit einer Extinktion/Well von 1,08 ermittelt. Insgesamt waren alle Messwerte signifikant über dem Wert der Negativkontrolle mit 0,79.

XTT-Test - direkt im Plasma mit steigender Konzentration

Durch die Erhöhung der Testkonzentrationen kam es zum signifikanten Verlust der enzymatischen Aktivität bei Caspofungin (1,46-1,12), beim Liposomalen Amphotericin B (1,21-0,88) und am stärksten bei Anidulafungin (1,47-0,17). Die Dehydrogenase-Aktivität stieg signifikant bei Fluconazol (1,52-2,00) und Voriconazol (1,08-1,35) mit zunehmender Konzentration. (siehe Anhang Tab. 35)

4.2.9 Apoptose

4.2.9.1 DNA-Fragmentierung

DNA-Fragmentierung im Medium

Die Detektion und Visualisierung von DNA-Strangbrüchen durch apoptotische Vorgänge erfolgte im TUNEL-Assay (Abb. 26). Bei der Auswertung von TUNEL-positiven und gleichsam morphologisch apoptotischen Zellen wurde festgestellt, dass Caspofungin mit 5,92 % und Fluconazol mit 4,92 % in der C_{\max} -Konzentration den höchsten signifikanten Anteil an apoptotischen Zellen aufwies. Bei der Negativkontrolle waren 3,67 % der Zellen avital. Unterhalb der Negativkontrolle wurde bei der Positivkontrolle 2,35 % und bei Anidulafungin 2,63 % apoptotische Zellen bestimmt. Mit einem Anteil von nur 0,60 % apoptotischer Zellen ist das Liposomale Amphotericin B die Substanz, wo signifikant am wenigsten dUTP's in kaum vorhandene DNA-Strangbrüche eingebaut wurde.

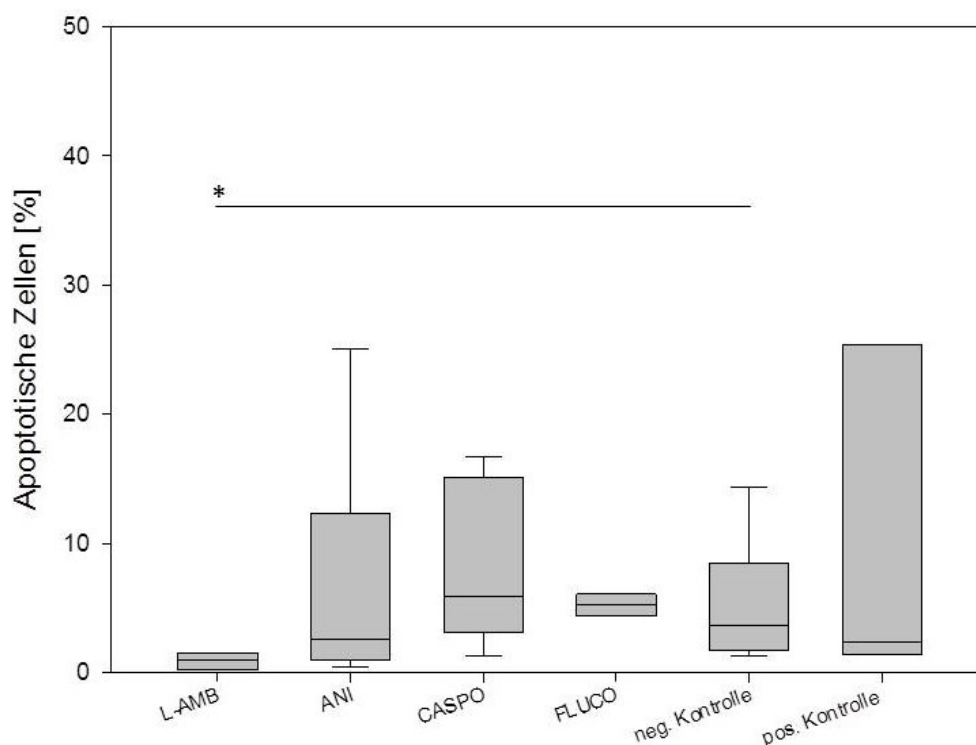


Abb. 26 Darstellung der TUNEL-positiven Zellen [%] in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium. Auf der x-Achse sind 5,7 mM L-AMB (Liposomales Amphotericin B) | 2,25 mM ANI (Anidulafungin) | 0,2 mM CASPO (Caspofungin) | 4,5 mM FLUCO (Fluconazol), sowie eine neg. und pos. Kontrolle aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

DNA-Fragmentierung im Medium mit steigender Konzentration

Konzentrationsabhängige Beeinflussung der DNA-Fragmentierung konnte eindeutig bei Anidulafungin (Abb. 27 A) bestimmt werden. Mit zunehmender Konzentration nahm die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant zu. Mit anfangs 2,63 % apoptotischer Zellen wurden bei der 10-fachen C_{max} -Konzentration 58,48 % apoptotische Zellen ermittelt. Auch beim Liposomalen Amphotericin B und Caspofungin konnte eine nicht signifikante geringfügige Zunahme der apoptotisch-positiven Zellen analysiert werden. Eine Abnahme der apoptotischen Zellen wurde bei Fluconazol gesehen, während bei C_{max} 4,92 % avitale Zellen durchflusszytometrisch detektiert wurden, gab es einen signifikanten Rückgang auf 0,57 % in der zehnfachen C_{max} -Konzentration.

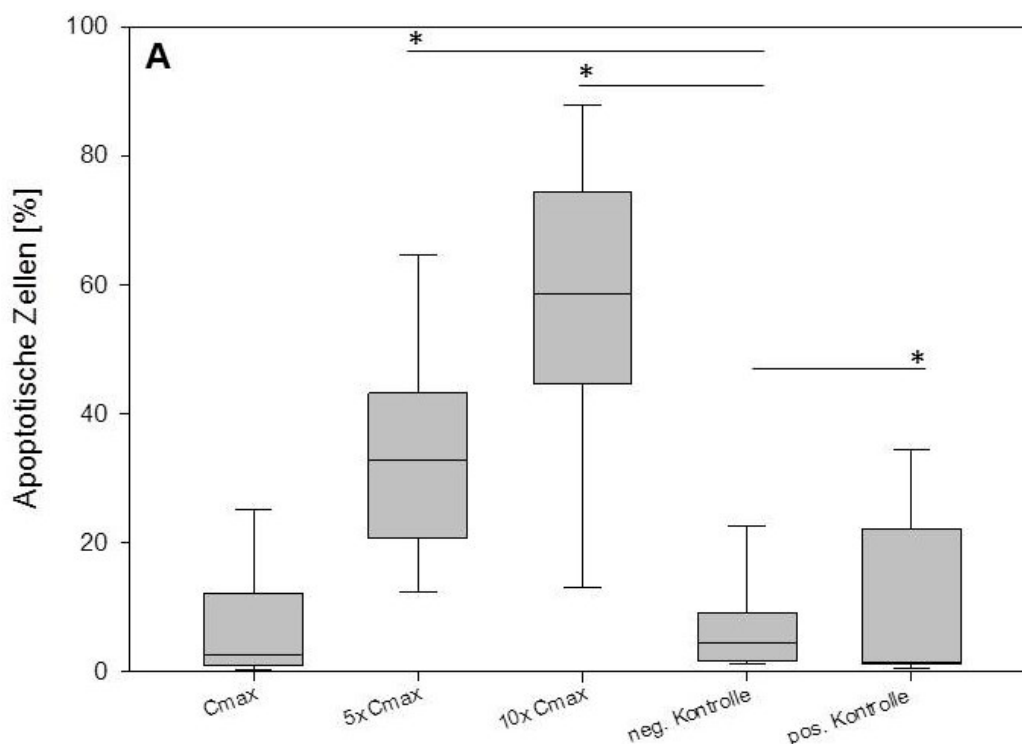


Abb. 27 Darstellung der TUNEL-positiven Zellen [%] von A) Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM). Es sind C_{max}, 5x C_{max}, 10x C_{max}-Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen. Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle sind dargestellt.

DNA-Fragmentierung im Plasma

Bei der Bestimmung der DNA-Fragmentierung der Testsubstanzen in der C_{max}-Konzentration im Plasma wurden höhere Messwerte gesehen. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit 8,4 % wurde bei allen anderen Testsubstanzen eine signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen gemessen. Bei Anidulafungin waren bei der C_{max}-Konzentration im Plasma 24,6 % der Zellen apoptotisch. Gefolgt vom Liposomalen Amphotericin B mit 21,8 % und Fluconazol mit 20,5 %. Bei Caspofungin wurden im Durchschnitt 15,2 % der Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays positiv getestet.

Die Steigerung der Wirkstoffmenge führt bei Anidulafungin (24,6-8,8 %) und bei Fluconazol (20,5-14,2 %) zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen. Während beim Liposomalen Amphotericin B eine geringe Zunahme (21,8-22,8 %) erfolgte, kam es zu einer signifikanten Zunahme (15,2-28 %) avitaler Zellen bei Caspofungin. (siehe Anhang Tab. 41)

4.2.9.2 Charakterisierung des CD95-Rezeptors

Charakterisierung des CD95-Rezeptors im Medium

Die Charakterisierung der Expression des CD95-Oberflächenrezeptors wurde nach 48 h nach Substratsubstanz untersucht. Eine signifikante Erhöhung der CD95-Rezeptor-Expression konnte im Vergleich zur Negativkontrolle bei keiner Testsubstanz in der C_{max}-Konzentration festgestellt

werden. Fluconazol (16,7 %) und Caspofungin (17,4 %) verhielten sich ähnlich wie die Kontrolle mit 18,1 % CD95-Rezeptor-positive Zellen. Bei der Positivkontrolle erfolgte nur bei 13,6 % der Zellen eine Expression von CD95. Bei Anidulafungin exprimierten 12,9 % der Zellen den Rezeptor, während beim Liposomalen Amphotericin B nur eine signifikant geringe Expression von 8,6 % bestimmt wurde.

Charakterisierung des CD95-Rezeptors im Medium mit steigender Konzentration

Bei Anidulafungin nahm die Expression mit zunehmender Konzentration ab. Anfangs waren es noch 12,9 % der Zellen, die den CD95-Rezeptor exprimierten, während bei der höchsten Konzentration nur noch 6,4 % der Zellen positiv waren (Abb. 28). Ähnliches wurde beim Liposomalen Amphotericin B beobachtet. In der C_{\max} -Konzentration wurden 8,6 % der Zellen durchflusszytometrisch positiv detektiert, während sich durch die Inkubation mit der zehnfachen C_{\max} -Konzentration die Anzahl auf 4,1 % verringerte. Bei allen Testkonzentrationen wurden bei Caspofungin und bei Fluconazol im Durchschnitt 16 % CD95-Rezeptor-positive Zellen ermittelt.

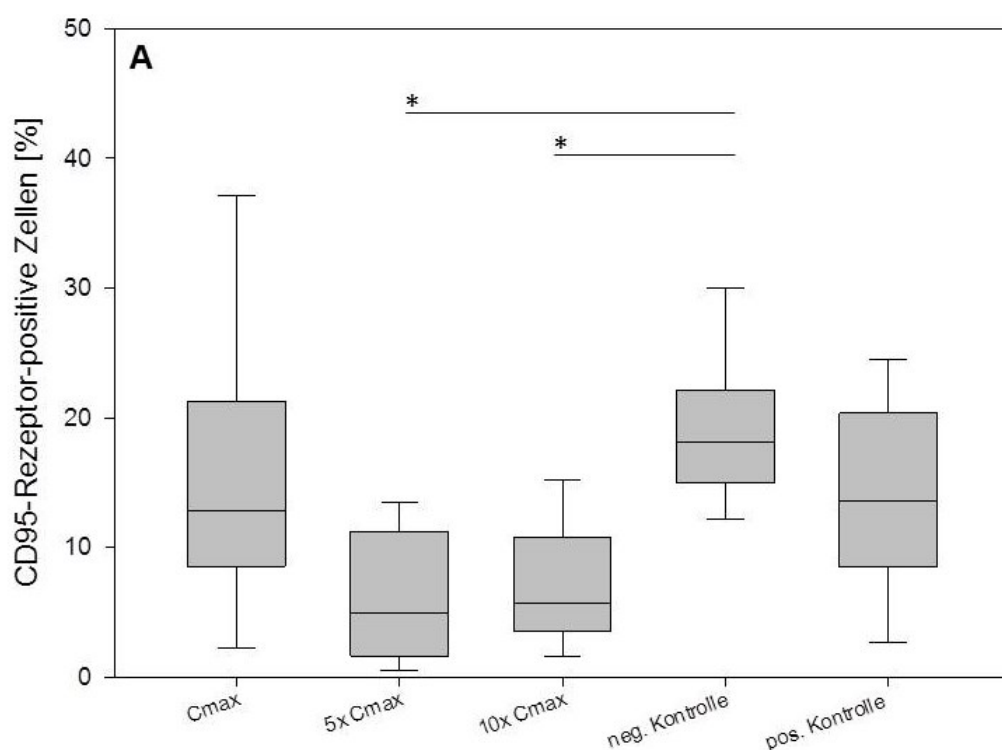


Abb. 28 Darstellung der CD95-Rezeptor-positiven Zellen [%] von Anidulafungin (2,25 M, 11,25 mM, 22,5 mM). Es sind C_{\max} , 5x C_{\max} , 10x C_{\max} -Konzentration im Medium, sowie die neg. und pos. Kontrolle auf der x-Achse aufgetragen. Es sind Median, 25/75 Perzentil, X als Ausreißer und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Charakterisierung des CD95-Rezeptors im Plasma

Die Ergebnisse der Expressionen im Plasma zeigten, dass die Anzahl der positiven Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Testsubstanzen kaum untereinander variierten. Im Gesamtdurchschnitt hatten 5,2 % der Zellen den CD95-Rezeptor exprimiert. Die höchste Anzahl an CD95-Rezeptor-positiven Zellen wurde bei der Positivkontrolle mit 7,6 %, nachfolgend von

Caspofungin mit 7 % und der Negativkontrolle mit 6,6 % ermittelt. Mit nur 1,4 % der Zellen gab es einen signifikanten Unterschied beim Liposomalen Amphotericin B. Mit zunehmender Wirkstoffmenge wurden nur minimale nicht signifikante Unterschiede bei den Testsubstanzen analysiert. (siehe Anhang Tab. 43)

4.3 Test-Validierung mit primären isolierten Hepatozyten

In primären humanen Hepatozyten wurden die Untersuchung der Zelltoxizität und die Untersuchung der CYP1A2-Induktion von vier Testsubstanzen (Paracetamol, Anidulafungin, Caspofungin, Fluconazol) durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle der eingesetzten humanen Hepatozyten hat parallel die Messung der Harnstoff- und Albuminfreisetzung als Funktionsparameter in den unbehandelten Kontrollzellen stattgefunden. Für die Bestimmung der Zelltoxizität wurden am 18.12.2013 humane Hepatozyten aus einem Leberresektat eines männlichen Spenders isoliert. Die Vitalität vor dem Ausplattieren betrug 72 %. Am 06.02.2014 wurden humane Hepatozyten aus einem Leberresektat eines männlichen Spenders mit einer Vitalität von 95 % für den Versuch zur CYP-Induktion ausplattiert. Neben den vier Testsubstanzen wurde in jedem Versuch die Negativkontrolle mit Zellkulturmedium HHMM genutzt. Als Positivkontrolle für den Versuch der Zelltoxizität kam 2 % Triton X-100 zum Einsatz. Weiterhin wurde eine 1,9 % Ethanol-Lösungsmittelkontrolle eingesetzt, welche der Ethanolkonzentration in 15,24 mM Paracetamol entsprach. Als Induktor der CYP1A2-Aktivität wurde 25 µM β -Naphthoflavon verwendet.

4.3.1 Bestimmung der Harnstoff- und Albuminkonzentration

In den Zellkulturüberständen an den Tagen 3, 4 und 5 wurde ermittelt, dass die humanen Hepatozyten in den 24-Well-Platten 2-3 mmol/l Harnstoff in Kultur produzierten. Die Menge an synthetisiertem und freigesetztem Albumin stieg von Tag 3 (2,8 µg/ml) im weiteren Kulturverlauf deutlich an und betrug am Tag 5 bereits 19,4 µg/ml. Die Messwerte der Qualitätskontrolle zur Harnstoff- und Albuminfreisetzung belegten die Funktionalität der eingesetzten humanen Hepatozytenkulturen für die folgenden Anwendungen.

4.3.2 Zellvitalität - MTT Assay

Zusätzlich zum MTT-Assay wurden lichtmikroskopische Bewertungen der Zellen durch die Beurteilung der Zellmorphologie nach 24 h bzw. 48 h der Testsubstanzzugabe durchgeführt. (siehe Tab. 12)

Tab. 12 Zellmorphologie humaner Hepatozyten in 24Well Platten nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation

Substanz	Konzentration	Zellmorphologie Tag 4 (nach 24 h Substanzgabe)	Zellmorphologie Tag 5 (nach 48 h Substanzgabe)
Anidulafungin	C_{max} (2,25 mM)	keine Auffälligkeiten	leicht geschädigt
	5x C_{max} (11,25 mM)	Zellen geschädigt, überwiegend rund	deutlich geschädigt, Zellen rund
	10x C_{max} (22,5 mM)	Zellen geschädigt, überwiegend rund	deutlich geschädigt, Zellen rund
Caspofungin	C_{max} (0,2 mM)	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
	5x C_{max} (1,0 mM)	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
	10x C_{max} (2,0 mM)	Monolayer gut, tote Zellen im Überstand	viele tote Zellen im Überstand, Monolayer drunter besser
Fluconazol	C_{max} (4,5 mM)	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
	5x C_{max} (22,5 mM)	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
	10x C_{max} (45,0 mM)	leicht geschädigt	leicht geschädigt
Paracetamol	1,52 mM	keine Auffälligkeiten	leichte Veränderung
	7,62 mM	keine Auffälligkeiten	leicht geschädigt
	15,24 mM	Zellen leicht geschädigt, z. T. rundlich	deutlich geschädigt
Negativkontrolle	HHMM	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten
Positivkontrolle	25 µl β -NF	keine Auffälligkeiten	keine Auffälligkeiten

Im Vergleich der Testsubstanzen wurde deutlich, dass Anidulafungin mit zunehmender Konzentration und Inkubationsdauer ein hohes Schädigungspotenzial aufwies. Paracetamol wirkte in seiner höchsten Konzentration hepatotoxisch und schädigte auch mit zunehmender Inkubationszeit die Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die Substanzen Caspofungin und Fluconazol kaum Veränderung, lediglich bei der höchsten Konzentration waren leichte morphologische Veränderungen der primär isolierten Hepatozyten zu erkennen. Die Messwerte der MTT-Analyse nach 24-stündiger Inkubation stimmten nur zum Teil mit der Zellmorphologie der Hepatozyten überein. In Abb. 29 sind die Daten der MTT-Analyse der Testsubstanzen dargestellt.

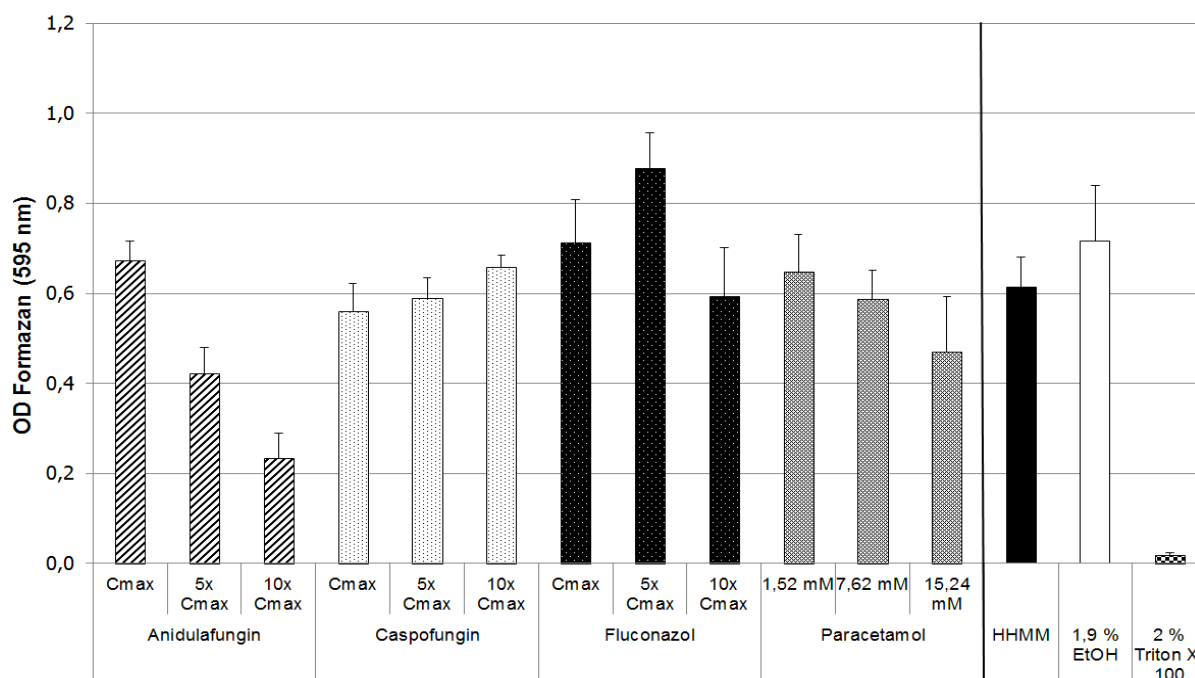


Abb. 29 MTT-Assay mit primär isolierten Hepatozyten nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen. Auf der y-Achse sind die erreichten Farbstoffumsätze der Zellen als Extinktionswerte (optische Dichte=OD) und auf der x-Achse sind C_{max}, 5x C_{max} und 10x C_{max} von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) | Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) | Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) | Paracetamol (1,52 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM), pos. (2 % Triton X-100) und Ethanol-Lösungsmittel-(EtOH) Kontrolle aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus sechs Einzelversuchen pro Datenpunkt, sowie *: p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle.

Um die mitochondriale Aktivität zu bestimmen wurde der MTT-Assay verwendet, dieser ermöglicht Rückschlüsse auf den Zustand des zellulären Energiehaushaltes. Nach Zugabe der SDS-Lösung konnte die optische Dichte (OD) bestimmt werden. Die OD in den unbehandelten Kontrollzellen (HHMM) betrug 0,6. Die Lösungsmittelkontrolle (1,9 % Ethanol) erreichte einen Messwert von 0,7. Entsprechend dem Viabilitätseinbruch der Zellen durch die Inkubation mit dem Detergenz 2 % Triton X-100 konnte ein starker Abfall in der Formazanbildung analysiert werden (OD=0,02). Demnach weisen hohe Absorptionswerte auf aktive Zellen hin.

Caspofungin erreichte Messwerte im Bereich von 0,56-0,65. Auch durch die Inkubation mit Fluconazol wurde die Viabilität der Zellen gemäß MTT-Assay nicht beeinträchtigt, lediglich das 5-fache von C_{max} führte zu einer leichten Erhöhung der OD (142 % gegenüber HHMM). Im Gegensatz dazu erbrachte die geringste Konzentration C_{max} von Anidulafungin Messwerte von 0,67. Mit steigender Konzentration wurden deutliche Auswirkungen auf die Zellviabilität beobachtet. Dieses spiegelte sich auch in den Messwerten wieder, dabei wurde eine OD von 0,42 bei dem 5-fachen von C_{max} (68 % gegenüber HHMM) und 0,23 bei dem 10-fachen von C_{max} (38 % gegenüber HHMM) ermittelt. Geringe Effekte (77 % gegenüber HHMM) auf die Lebens- und Metabolismusfähigkeit der Zellen zeigte Paracetamol lediglich in der höchsten Konzentration (15,24 mM).

4.3.3 EROD-Assay und Proteinbestimmung

In Abb. 30 ist deutlich zu erkennen, dass keine der eingesetzten Substanzen die Aktivität des CYP1A2-Enzyms induzierte. Die ermittelten Messwerte betrugen 1,0 bis 1,5 pmol/ml/60 min Resorufin und lagen damit im Bereich der Negativkontrolle HHMM von 1,0 pmol/ml/60 min. Im Gegensatz dazu führte die Positivkontrolle mit 25 µM β -Naphthoflavon in den humanen Hepatozyten zu einer starken Induktion der CYP1A2-Aktivität (Steigerung um den Faktor 13,8 gegenüber der HHMM-Kontrolle).

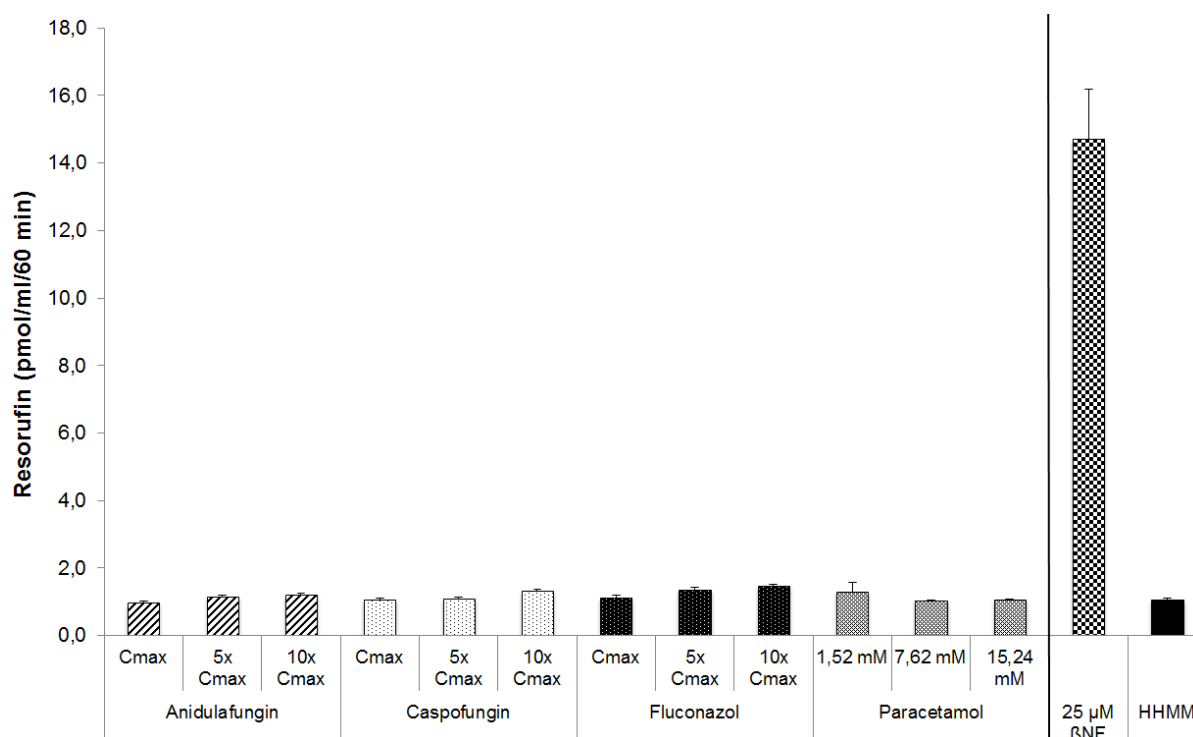


Abb. 30 Induktion der CYP1A2-Aktivität in humanen Hepatozyten in 24- Well-Platten bei Substanzgabe für 48 h von Tag 3 bis 5 der Kultur. Auf der y-Achse sind die erreichten umgesetzten Resorufinmengen [pmol/ml/60min] und auf der x-Achse sind C_{max}, 5x C_{max} und 10x C_{max} von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) | Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) | Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) | Paracetamol (1,25 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM) und pos. (25 µM β NF) Kontrolle aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standard-abweichungen aus sechs Einzelversuchen pro Datenpunkt, sowie *: p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle.

Die Menge des gebildeten Resorufins nach 48-stündiger Induktion wurde gegen den Proteingehalt der Kulturen normalisiert. Dabei wurde die Induktion durch 25 µM β -Naphthoflavon mit einer 12-fachen Steigerung bestätigt. Bei den Substanzen Caspofungin, Anidulafungin sowie Paracetamol wurde jeweils in der höchsten Konzentration im Gegensatz zur Kontrolle ein deutlich geringerer Proteingehalt der Zellen gemessen (ca. 50 %). Die Reduzierung ist durch die Schädigung der Zellen durch die applizierten Substanzen bedingt. Bei Anidulafungin und Paracetamol in der jeweils mittleren Konzentration wiesen die Kulturen ebenfalls einen leicht verminderten Proteingehalt auf. Fluconazol zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen innerhalb der Testkonzentrationen. Nach Normalisierung der Resorufin-

Messwerte mit dem Proteingehalt wurde für die genannten Substanzen und Konzentrationen eine Verdopplung der Resorufinkonzentration (pmol/min*mg) gegenüber der Negativkontrolle errechnet (Abb. 31).

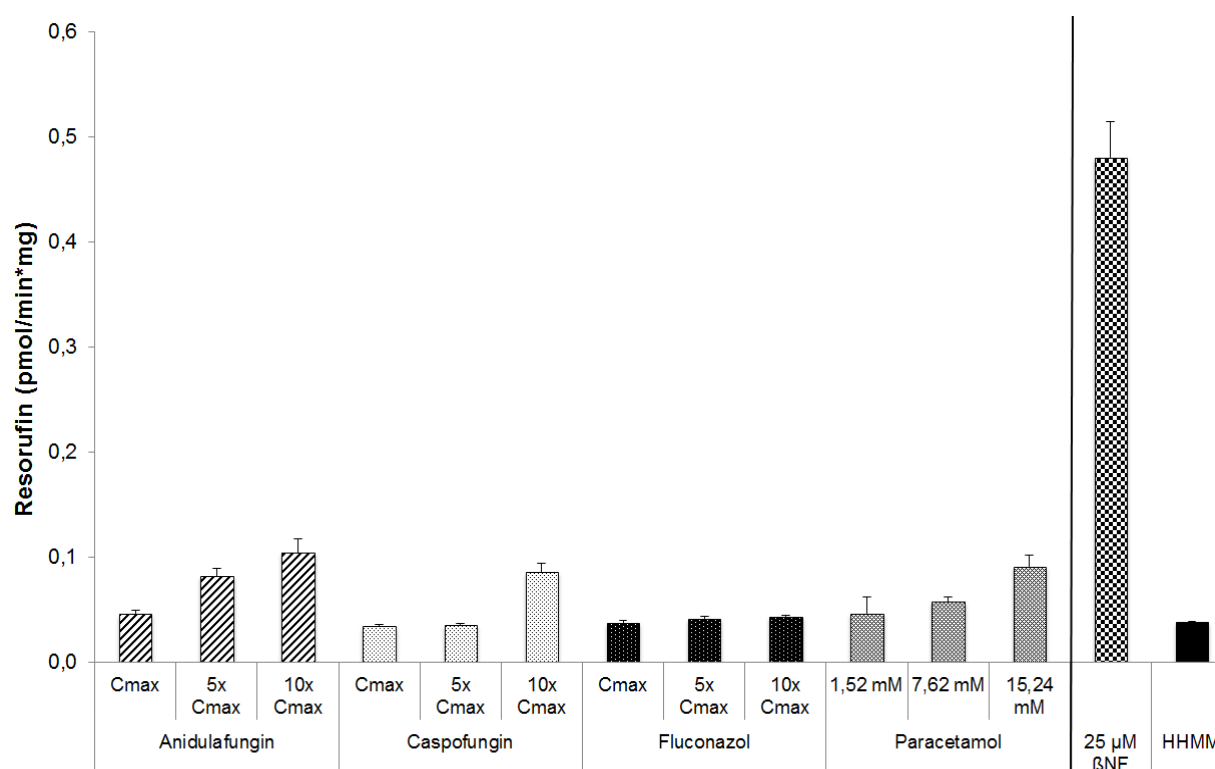


Abb. 31 Induktion der CYP1A2-Aktivität in humanen Hepatozyten in 24well Platten bei Substanzgabe für 48 h von Tag 3 bis 5 der Kultur. Auf der y-Achse sind die erreichten umgesetzten Resorufinmengen [pmol/ml/60min] und auf der x-Achse sind C_{max}, 5x C_{max} und 10x C_{max} von Anidulafungin (2,25 mM, 11,25 mM, 22,5 mM) | Caspofungin (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) | Fluconazol (4,5 mM, 22,5 mM, 45 mM) | Paracetamol (1,25 mM, 7,62 mM, 15,24 mM) sowie eine neg. (HHMM) und pos. (25 µM βNF) Kontrolle aufgetragen. Mittelwerte ± Standardabweichungen nach Normalisierung sind gegen den Proteingehalt dargestellt.

Keine der Testsubstanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des CYP1A2-Enzyms der HepG2/C3A.

4.4 Zusammenfassung

4.4.1 Liposomales Amphotericin B

Beim Liposomalen Amphotericin B (Tab. 13) wurde eine hohe Mikroalbuminsyntheseleistung sowie eine gesteigerte Aktivität des Enzymsystems CYP1A2, im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle festgestellt. Es konnte kein Einfluss auf die Zellzahl bestimmt werden, obwohl die Vitalität deutlich unter der Negativkontrolle (etwa 22 %) lag. Allerdings stiegen Zellzahl und Vitalität mit zunehmender Konzentration. Bei der LDH-Freisetzung lagen mit Ausnahme des Wertes von Tag 6 der C_{max}-Konzentration die Messwerte im Normalbereich. Bei der DNA-Fragmentierung und der CD95-Expression wurden deutlich niedrige Ergebnisse ermittelt. Beim indirekten XTT lagen die Werte unterhalb der Negativkontrolle, während beim direkten die Aktivität mit zunehmender Konzentration gestiegen ist.

Tab. 13 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) vom Liposomales Amphotericin B von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil und *: $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Parameter	verwendete Konzentrationen			neg. Kontrolle	pos. Kontrolle
	C_{\max} (5,73 mM)	$5 \times C_{\max}$ (28,63 mM)	$10 \times C_{\max}$ (57,25 mM)		
ZZ (x 100 000)	6,05 * 5,23 / 7,63	11,1 * 8,98 / 12	10,9 * 9,13 / 13,3	6,83 6,14 / 7,4	1,35 * 0,37 / 1,78
Vitalität [%]	72,66 * 66,04 / 76,67	87,28 * 82,98 / 88,26	88,05 * 83,23 / 91,3	94,12 91,88 / 95,42	37,65 * 28,4 / 45,99
LDH (3d) [U/l]	70 63,5 / 90,25	57 * 46 / 68	56,5 * 51,25 / 75	70,5 54 / 97	192 * 163,75 / 214,5
LDH (6d) [U/l]	271,5 * 249,25 / 295,75	133,5 108,5 / 206,75	144 117,25 / 159	147,5 101,5 / 156,88	119 * 83,25 / 130,75
XTT (indirekt)	0,832 * 0,741 / 0,971	0,788 * 0,707 / 1,053	0,965 0,728 / 1,201	0,983 0,814 / 1,12	1,262 1,189 / 1,348
XTT (direkt)	0,778 * 0,728 / 0,876	1,979 1,199 / 2,141	1,458 0,590 / 1,786	1,51 1,384 / 1,679	0,221 * 0,216 / 0,240
MA [mg/l]	11,4 * 8,43 / 15,33	18,55 * 14,93 / 21,18	14,15 * 12,88 / 20,85	7,01 6,47 / 8,2	0 * 0 / 0
CYP1A2 (pmol/l)	6,382 * 3,84 / 8,323	6,356 * 3,898 / 8,228	6,48 * 4,549 / 9,21	3,092 2,29 / 4,217	5,387 * 3,521 / 7,304
DNA (+) Zellen [%]	0,60 * 0,23 / 1,09	0,69 * 0,35 / 1,02	1,23 * 0,79 / 1,43	3,67 1,67 / 8,44	2,35 1,44 / 17,38
CD95 (+) Zellen [%]	8,56 * 5,83 / 9,55	4,87 * 2,40 / 6,96	4,11 * 2,0 / 6,06	18,11 15,13 / 21,92	13,58 * 8,61 / 18,22

Zz-Zellzahl, LDH-Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), MA-Mikroalbumin, CYP1A2- Cytochrom P450 - zur Familie 1, zur Unterfamilie A und ist das 2. Enzym, DNA- Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid), CD95-Cluster of Differentiation 95

4.4.2 Anidulafungin

Bei Anidulafungin (Tab. 14) sind deutlich negative konzentrationsabhängige Beeinträchtigungen der Zellen nach der Inkubation in höheren Wirkstoffmengen erkennbar. Dabei war ein starker Vitalitäts- und Zellzahlverlust, eine stark beeinträchtigte Mikroalbuminsynthese, Erhöhung der LDH-Werte am Tag 3 und niedrige Werte am Tag 6, eine stark reduzierte Dehydrogenasen-Aktivität (XTT, direkt) sowie eine signifikante hohe Anzahl an DNA-positiven Zellen auffällig. Die CD95-Expression nahm mit steigender Konzentration ab. Bei CYP3A4 kam es durch Steigerung der Wirkstoffmenge zur Aktivitätszunahme, während die CYP1A2-Aktivität deutlich unterhalb der Negativ- und Positivkontrolle in allen Konzentrationen ermittelt wurde.

Tab. 14 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Anidulafungin von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil und *: $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Parameter	C_{\max} verwendetes Konzentrationen (2,25 mM)	5 C_{\max} (11,25 mM)	10 C_{\max} (22,50 mM)	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle
ZZ (x 100 000)	7,10 6,3 / 8,4	0,3 * 0,3 / 0,5	0 * 0 / 0	6,83 6,14 / 7,4	1,35 * 0,37 / 1,78
Vitalität [%]	79,76 * 76,25 / 81,92	14,29 * 10,2 / 22,95	0 * 0 / 0	94,12 91,88 / 95,42	37,65 * 28,4 / 46
LDH (3d) [U/l]	66 58,5 / 82,5	354 * 314 / 401	412 * 393 / 476	70,5 54 / 97	192 * 163,75 / 214,5
LDH (6d) [U/l]	203 * 157,5 / 222,5	141 103,5 / 155	72 * 48 / 88	147,5 101,5 / 156,88	119 * 83,25 / 130,75
XTT (indirekt)	0,69 * 0,648 / 0,813	0,596 * 0,558 / 0,643	0,616 * 0,587 / 0,661	0,983 0,814 / 1,12	1,262 * 1,189 / 1,348
XTT (direkt)	1,206 1,037 / 1,454	0,182 * 0,147 / 0,196	0,149 * 0,127 / 0,179	1,51 1,384 / 1,679	0,221 * 0,216 / 0,240
MA [mg/l]	13,5 * 11 / 15,9	0 * 0 / 0	0 * 0 / 0	7,01 6,47 / 8,2	0 * 0 / 0
CYP1A2 [pmol/l]	2,536 1,565 / 5,305	3,926 1,602 / 5,514	2,179 1,616 / 5,532	3,092 2,29 / 4,22	5,387 * 3,521 / 7,304
CYP3A4 [pmol/l]	4,65 * 4,05 / 5,33	7,41 * 6,76 / 7,71	19,88 * 9,71 / 29,19	3,94 3,73 / 4,61	4,65 * 4,02 / 4,93
DNA (+) Zellen [%]	2,63 1,15 / 10,58	32,75 * 21,83 / 37,69	58,48 * 48,10 / 68,96	3,67 1,67 / 8,44	2,35 1,44 / 17,38
CD95 (+) Zellen [%]	12,85 8,65 / 18,47	4,92 * 1,94 / 8,99	6,38 * 4,46 / 11,37	18,11 15,13 / 21,92	13,58 * 8,61 / 18,22

Zz-Zellzahl, LDH-Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), MA-Mikroalbumin, CYP1A2- Cytochrom P450 - zur Familie 1, zur Unterfamilie A und ist das 2. Enzym, CYP3A4- Cytochrom P450 - zur Familie 3, zur Unterfamilie A und ist das 4. Enzym, DNA- Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid), CD95-Cluster of Differentiation 95

4.4.3 Caspofungin

Bei der Hepatotoxizitätstestung von Caspofungin (Tab. 15) wurde deutlich, dass nach Inkubation die HepG2/C3A-Zellen eine ausgeprägte Mikroalbuminsynthese besaßen. Bei der Aktivität von Enzymsystemen, insbesondere bei CYP1A2 und CYP3A4 war eindeutig, dass Caspofungin weder eine Induktion noch eine Inhibition der Enzyme bewirkte. Die Zellzahl und Vitalität wurden nur geringfügig beeinträchtigt; wahrscheinlich resultierten aufgrund dessen die LDH-Werte im Bereich der Negativkontrolle. Die mitochondriale Aktivität wurde durch Caspofungin geringfügig negativ beeinflusst, die Ergebnisse liegen unterhalb der Negativkontrolle. Bei der Bestimmung der DNA-Fragmentierung wurden signifikant mehr DNA-positive Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle ermittelt, während die CD95-Expression im Bereich der Negativkontrolle bestimmt wurde.

Tab. 15 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Caspofungin von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil und *: $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Parameter	C_{\max} verwendete Konzentrationen (0,2 mM)	5 C_{\max} Konzentrationen (1 mM)	10 C_{\max} (2 mM)	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle
ZZ (x 100 000)	6,25 3,95 / 8,73	7,03 4,66 / 8,44	6,63 5,24 / 7,93	6,83 6,14 / 7,4	1,35 * 0,37 / 1,78
Vitalität [%]	88,90 * 85,71 / 92,29	92,23 90,68 / 94,80	92,02 88,15 / 94,12	94,12 91,88 / 95,42	37,65 * 28,4 / 46
LDH (3d) [U/l]	46,5 * 40,75 / 59,25	44,5 * 39,75 / 52,75	40 * 36,75 / 45,5	70,5 54 / 97	192 * 163,75 / 214,5
LDH (6d) [U/l]	241 177,75 / 246	182,5 155,75 / 218	163 142,5 / 191,5	147,5 101,5 / 156,88	119 * 83,25 / 130,75
XTT (indirekt)	0,932 0,732 / 1,162	0,750 * 0,687 / 1,023	0,767 * 0,698 / 1,110	0,983 0,814 / 1,12	1,262 * 1,189 / 1,348
XTT (direkt)	0,848 * 0,676 / 1,025	1,262 0,996 / 1,607	0,944 * 0,716 / 1,062	1,51 1,384 / 1,679	0,221 * 0,216 / 0,240
MA [mg/l]	7,57 6,97 / 8,41	7,11 6,17 / 9,27	6,79 5,9 / 7,83	7,01 6,47 / 8,2	0 * 0 / 0
CYP1A2 [pmol/l]	2,490 1,649 / 4,595	2,489 * 1,688 / 5,006	2,431 * 1,705 / 4,720	3,092 2,29 / 4,217	5,387 * 3,521 / 7,304
CYP3A4 [pmol/l]	4,08 3,76 / 4,58	3,99 3,84 / 4,49	4,06 3,77 / 4,56	3,94 3,73 / 4,61	4,65 * 4,02 / 4,93
DNA (+) Zellen [%]	5,92 * 4,58 / 13,90	8,17 * 5,14 / 12,55	8,10 * 4,50 / 14,76	3,67 1,67 / 8,44	2,35 1,44 / 17,38
CD95 (+) Zellen [%]	17,40 15,63 / 19,22	19,57 16,90 / 22,71	15,96 15,18 / 23,07	18,11 15,13 / 21,92	13,58 8,61 / 18,22

Zz-Zellzahl, LDH-Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), MA-Mikroalbumin, CYP1A2- Cytochrom P450 - zur Familie 1, zur Unterfamilie A und ist das 2. Enzym, CYP3A4- Cytochrom P450 - zur Familie 3, zur Unterfamilie A und ist das 4. Enzym, DNA- Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid), CD95-Cluster of Differentiation 95

4.4.4 Fluconazol

Bei der Bestimmung der Hepatotoxizität von Fluconazol (Tab. 16) war auffällig, dass die Zellvitalität und Zellzahl signifikant beeinträchtigt wurden. Diese Werte korrelieren mit der Freisetzung von LDH. Am Tag 6 wurde das Doppelte an LDH im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Bei der CYP1A2-Bestimmung wurden deutlich geringe Umsetzungsraten im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle bestimmt, während bei CYP3A4 die Höhe der Aktivität im Bereich der Negativkontrolle lag. Die mitochondriale Dehydrogenasen-Aktivität lag unterhalb der Negativkontrolle. Es konnten keine Auffälligkeiten bei der Apoptose-Bestimmung im Vergleich zur Negativkontrolle ermittelt werden.

Tab. 16 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Fluconazol von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil und *: $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Parameter	C_{\max} verwendete Konzentrationen (4,5 mM)	5 C_{\max} Konzentrationen (22,5 mM)	10 C_{\max} Konzentrationen (45 mM)	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle
ZZ (x 100 000)	5,8 * 5,6 / 6,5	5,6 * 5 / 6,2	5,8 * 5,6 / 6,6	6,83 6,14 / 7,4	1,35 * 0,37 / 1,78
Vitalität [%]	75 * 71,94 / 78,76	77,78 * 75,31 / 82,81	78,79 * 75,34 / 80,25	94,12 91,88 / 95,42	37,65 * 28,4 / 46
LDH (3d) [U/l]	144 * 107,75 / 182,25	99 * 75 / 131,75	79 63,5 / 101,75	70,5 54 / 97	192 * 163,75 / 214,5
LDH (6d) [U/l]	316 * 279,75 / 365,5	286,5 * 254,5 / 315	246 * 207,25 / 265	147,5 101,5 / 156,88	119 * 83,25 / 130,75
XTT (indirekt)	0,882 0,835 / 1,02	0,724 * 0,683 / 0,798	0,713 * 0,676 / 0,769	0,983 0,814 / 1,12	1,262 * 1,189 / 1,348
XTT (direkt)	1,411 1,199 / 1,666	1,555 1,277 / 1,903	1,798 1,4 / 2,159	1,51 1,384 / 1,679	0,221 * 0,216 / 0,240
MA [mg/l]	10,8 * 10,5 / 14,1	5,5 4,62 / 8,98	6,71 5,41 / 9,29	7,01 6,47 / 8,2	0 * 0 / 0
CYP1A2 [pmol/l]	1,974 * 1,513 / 4,21	1,929 * 1,377 / 4,262	1,863 * 1,468 / 3,879	3,092 2,29 / 4,217	5,387 * 3,521 / 7,304
CYP3A4 [pmol/l]	4,39 3,60 / 4,77	4,26 3,54 / 4,72	4,45 3,58 / 4,75	3,94 3,73 / 4,61	4,65 * 4,02 / 4,93
DNA (+) Zellen [%]	4,92 * 4,55 / 5,28	4,59 * 4,55 / 4,78	0,57 * 0,46 / 0,65	3,67 1,67 / 8,44	2,35 1,44 / 17,38
CD95 (+) Zellen [%]	16,73 15,56 / 27,80	14,00 13,62 / 22,22	14,65 10,34 / 27,72	18,11 15,13 / 21,92	13,58 8,61 / 18,22

Zz-Zellzahl, LDH-Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), MA-Mikroalbumin, CYP1A2- Cytochrom P450 - zur Familie 1, zur Unterfamilie A und ist das 2. Enzym, CYP3A4- Cytochrom P450 - zur Familie 3, zur Unterfamilie A und ist das 4. Enzym, DNA- Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid), CD95-Cluster of Differentiation 95

4.4.5 Voriconazol

In der Tab. 17 sind die Messwerte der Hepatotoxizitätsüberprüfung von Voriconazol dargestellt. Die Inkubation mit Voriconazol ergab eine Beeinträchtigung der Zellzahl mit einhergehendem starkem Vitalitätsverlust. Es wurden etwa 30 % weniger vitale Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Die Freisetzung von LDH am Tag 3 war unauffällig, während am Tag 6 signifikant erhöhte LDH-Werte bestimmt wurden. Voriconazol-inkubierte Zellen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant niedrige Mikroalbuminsynthese, die mit zunehmender Konzentrationssteigerung zusätzlich negativ beeinträchtigt wurde. Die CYP1A2-Aktivität und die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität (XTT) waren ebenfalls unterhalb der Negativkontrolle und nahmen bei Konzentrationssteigerung mit Voriconazol weiter ab.

Tab. 17 Übersicht der getesteten Parameter (Hepatotoxizitätsassay) von Voriconazol von den unterschiedlichen Testkonzentrationen in Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil und *: $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Parameter	C_{\max} verwendete Konzentrationen (0,25 mM)	5 C_{\max} (1,25 mM)	10 C_{\max} (2,50 mM)	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle
ZZ (x 100 000)	5,2 * 4,25 / 6,4	5,4 * 4,4 / 6,1	5,2 * 4,8 / 6,05	6,83 6,14 / 7,4	1,35 * 0,37 / 1,78
Vitalität [%]	67,35 * 62,92 / 71,27	67,86 * 62,49 / 70,85	68,57 * 62,81 / 73,46	94,12 91,88 / 95,42	37,65 * 28,4 / 46
LDH (3d) [U/l]	73 52,75 / 145	73,5 50,75 / 135	69 45,75 / 111,25	70,5 54 / 97	192 * 163,75 / 214,5
LDH (6d) [U/l]	279 * 197,75 / 313	263 * 182,75 / 295	219 * 140,75 / 279,25	147,5 101,5 / 156,88	119 * 83,25 / 130,75
XTT (indirekt)	0,754 * 0,695 / 0,837	0,608 * 0,622 / 0,724	0,605 * 0,545 / 0,678	0,983 0,814 / 1,12	1,262 * 1,189 / 1,348
XTT (direkt)	1,308 0,931 / 1,699	1,166 * 0,698 / 1,74	0,829 * 0,600 / 1,829	1,51 1,384 / 1,679	0,221 * 0,216 / 0,240
MA [mg/l]	6,08 * 5,44 / 7,31	6,02 * 5,18 / 7,06	5,56 * 4,71 / 7,25	7,01 6,47 / 8,2	0 * 0 / 0
CYP1A2 [pmol/l]	2 * 1,384 / 4,749	1,998 * 1,399 / 4,868	1,897 * 1,432 / 5,052	3,092 2,29 / 4,217	5,387 * 3,521 / 7,304

Zz-Zellzahl, LDH-Laktat-Dehydrogenase, XTT- (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), MA-Mikroalbumin, CYP1A2- Cytochrom P450 - zur Familie 1, zur Unterfamilie A und ist das 2. Enzym, DNA- Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid), CD95-Cluster of Differentiation 95,

5 DISKUSSION

Der auf humane Hepatozyten basierende Biosensor, der zur Früherkennung und zur Therapiekontrolle konzipiert ist [214, 215], wurde im Vorfeld im Rahmen einer Sepsis-Therapie-Studie EISS (Extracorporeal Immune Support System), sowie bei zwei Sepsis-Diagnostik- und Lebertransplantations-Studien erprobt [216]. Darüber hinaus fand der Test Anwendung bei der Überprüfung der Hepatotoxizität von Testreihen ausgewählter Muskelrelaxantien [217] und Albuminzubereitungen [218]. Im Rahmen der angewandten Forschung soll dieser zellbasierte Test weiter standardisiert, validiert und auch weiterhin zur Untersuchung der Hepatotoxizität von Wirkstoffen und Arzneimittelzubereitungen eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine standardisierte und genetisch charakterisierte Master- und Workingzellbank unter kontrollierten Bedingungen generiert, um die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse der Hepatotoxizitätstestung sowie im Vergleich zu vorherigen Testversuchen zu gewährleisten [219]. Die eingesetzte Zelllinie wurde vor der Versuchsdurchführung auf Mycoplasmenfreiheit und auf mikrobielle Kontaminationen untersucht, um ein falsch-negatives Ergebnis der Zytotoxizitätstestung durch kontaminierte Mikroorganismen ausschließen zu können. Es wurden keine Verunreinigungen ermittelt. Durch die Vitalitäts- und Funktionsanalysen wurde sichergestellt, dass keine signifikanten Unterschiede im Zellstoffwechsel und Wachstum der Ausgangszellen im Vergleich zu den vorherigen Zellen vorlagen. Alle später durchgeführten Tests konnten auf Grundlage einer gleichbleibenden und bekannten Zellqualität durchgeführt werden.

Zur Beurteilung von Zellschädigungen wurde bei allen Testreihen eine Positivkontrolle mitgeführt. Das Verständnis von Medikamenten-assoziierten pathophysiologischen Vorgängen kann anhand bekannter Toxizität von Modellsubstanzen durch messbare und reproduzierbare Ergebnisse verbessert werden [41]. Als Positivkontrolle wurde Paracetamol (PCM) eingesetzt. Denn neben Tetrachlorkohlenwasserstoff, Chloroform oder Dichlormethan stellt PCM eine Modellsubstanz für die Hepatotoxizität dar [220]. PCM, häufig angewendetes Schmerzmittel mit einer geringen therapeutischen Breite, wirkt in hohen Dosierungen hepatotoxisch [55]. Bei Überdosierung von PCM kommt es zu einer Glutathion (GSH)-Verarmung der Leberzellen (vgl. 1.2 Paracetamol als Modellsubstanz für Hepatotoxizität). Dies hat zwei wesentliche Folgen, die letztlich zum Verlust der Leberfunktion führen können. Einerseits reagiert der toxische Metabolit N-Acetyl-p-Benzochinonimin (NAPQI) mit den Zellproteinen und hemmt die elementare zelluläre Stoffwechselfunktion. Andererseits kommt es zu oxidativen Schädigung der Leberzellen (Lebernekrose), da GSH zu den wichtigsten zellulären Antioxidantien gehört [221]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Ausnahme des Apoptoseparameter die schädigende Wirkung von PCM hinsichtlich Zellviabilität, Morphologie und Cytochromaktivität (CYP1A2, CYP3A4) bestätigt. Durch die Inkubation kam es zur starken Beeinflussung der Zellzahl und -vitalität, zur

eingeschränkten Mikroalbuminsynthese sowie zur erhöhten Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH). Aufgrund der Metabolisierung über das Cytochrom (CYP)-Enzymsystem wurden erhöhte Aktivitäten beim CYP1A2 und CYP3A4 bestimmt. Weiterhin kam es zur Einschränkung der Synthese mitochondrialer Dehydrogenasen. Es zeigte sich, dass PCM in einer Konzentration von 15,24 mM eine sehr geeignete Substanz als Positivkontrolle für weitere Testsubstanzen ist. Toxikologisches Potenzial von PCM wurde ebenfalls bei einer Langzeit-Hepatozytenkultur durch eine deutliche Reduzierung der Albuminsynthese um bis zu 75 bis 80 % gezeigt [90]. Aus den Ergebnissen der Apoptose-Bestimmung in Vorversuchen mit drei unterschiedlichen PCM-Konzentrationen (1,52 mM | 7,62 mM | 15,24 mM) lässt sich ableiten, dass der Vitalitätsverlust der Leberzellen bereits bei niedrigen PCM-Konzentrationen zu verzeichnen war, während DNA-Fragmentierung jedoch erst bei höheren PCM-Konzentrationen stattfand. Die Tatsache, dass ein Vitalitätsabfall bereits bei niedrigen Konzentrationen auftritt, bei denen keine DNA-Fragmentierung nachzuweisen ist, lässt vermuten, dass es sich nicht primär um einen durch DNA-Fragmentierung verursachten Zelluntergang in Sinne einer Apoptose handelt. Die Paracetamol-Hepatotoxizität ist ein typisches Beispiel für die Überlappung von Nekrose und Apoptose [222, 223].

Zur Validierung von Ergebnissen mit hepatozytären Zelllinien gelten isolierte humane primäre Hepatozyten als „Goldstandard“ für in vitro Modelle [88, 89]. Aufgrund dessen wurden zur Methodenetablierung und Funktionsüberprüfung (CYP1A2, Vitalität- und Proliferationstests) humane primäre isolierte Hepatozyten (Firma Primacyt, Schwerin) eingesetzt. Nach der Isolierung konnten die Hepatozyten im verwendeten HEPAC-System [90, 224], ein standardisiertes und validiertes Langzeit-Kultursystem, in vitro differenzierte leberspezifische Funktionen für mehrere Tage aufrecht-halten, sowie den Phase I und II Metabolismus und die Proteinsynthese. Im Rahmen des Proteinmetabolismus der Hepatozyten werden Aminosäuren und Proteine im Harnstoffzyklus zu Harnstoff abgebaut. Die analysierte Harnstoffproduktion der primär isolierten Hepatozyten diente als Funktionsmarker und konnte im Rahmen der Funktionsüberprüfung erfolgreich getestet werden. Die EROD-Synthese wurde unter Protein-gehalt-Anpassung durch Induktion von CYP1A2 mit β -Naphthoflavon durchgeführt. Runge et al. konnten in acht Tage kultivierte humane Hepatozyten die Induktion der EROD-Aktivität durch 48 h Einwirkung von β -Naphthoflavon zeigen [225]. Anidulafungin, Caspofungin, Fluconazol und Paracetamol zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf die CYP1A2-Aktivität. Allerdings können die Enzymaktivitäten der primär isolierten Hepatozyten durch Vorerkrankungen und/ oder Medikation der Zellspender bereits beeinflusst worden sein und dadurch deutliche Unterschiede in der Stimulierbarkeit in den einzelnen Experimenten begründen [226]. Die Bestimmung der EROD-Synthese unter Induktion der CYP1A2-Aktivität mit 3-Methylcholanthren (3-MCH) der HepG2/C3A zeigte ebenfalls, dass die Antimykotika keinen signifikanten Einfluss auf die CYP1A2-Aktivität hatten, jedoch höhere Aktivitäten im Vergleich zu den primär isolierten

Hepatozyten. Die Testung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen primärer Hepatozyten wurde unter Verwendung von MTT bestimmt. Zusätzlich wurden die Antimykotika-inkubierten Zellen morphologisch beobachtet. Die Beeinträchtigungen der Zellen durch Anidulafungin, Caspofungin und Fluconazol wurden auch in unseren Untersuchungen gesehen. Proliferierende Zellen haben eine gesteigerte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen und setzen mehr MTT um. Anidulafungin und Paracetamol zeigten konzentrationsabhängige Beeinflussungen der mitochondrialen Aktivität, während Caspofungin geringe positive Effekte auf die Metabolismusfähigkeit der Zellen zeigte. Gemäß MTT-Assay wurden keine Beeinträchtigungen durch Fluconazol beobachtet, lediglich in der 5-fachen Konzentration führte Fluconazol zur leichten Erhöhung. Die Ergebnisse der metabolischen Aktivität der HepG2/C3A-Zellen mittels XTT zeigten in unserem Testsystem ähnliche Trends nach Inkubation mit den Antimykotika-zubereitungen. XTT sowie MTT dienen der Quantifizierung der metabolischen Aktivität der Zellen über Tetrazolium-Salze. Der häufig verwendete MTT, hauptsächlich für validierte Zytotoxizitätstests, hat jedoch den Nachteil der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Formazans [227, 228]. XTT ist eine Weiterentwicklung bei der im Vergleich zu MTT ein lösliches Formazan entsteht. Da keine Verwendung von toxischen Lösungsmitteln bei XTT notwendig ist, besteht der Vorteil in der einfachen Handhabung, sowie die Möglichkeit die Zellen nach Testdurchführung weiter zu verwenden [224]. Im Gegensatz zum membranengängigen MTT dringt XTT aufgrund der Ladung nicht in die Zelle ein. (vgl. 3.4.4 Abb. 5) Generell sind die geringe Stabilität der Formazanprodukte und die relativ niedrigen Absorptionswerte bei den Bestimmungen limitierend, allerdings sind die Assays besonders bei toxikologischen Untersuchungen mit adhären Zellen geeignet [198]. In Kooperation mit der Firma Primacyt wurden die Testergebnisse der MTT-Analyse von Anidulafungin, Caspofungin, Fluconazol und Paracetamol mit den primär isolierten Spender-Hepatozyten im Vergleich zu den Ergebnissen unter Verwendung von HepG2/C3A bestätigt, hinsichtlich der CYP1A2-Aktivitäten wurden geringe Abweichungen bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung des hepatotoxischen Potenzials intensivmedizinisch relevanter Antimykotika Medium- als auch Plasmaversuchsreihen durchgeführt. Die HepG2/C3A-Zellen werden standardmäßig im Medium kultiviert, aufgrund dessen und der Darstellung der Situation bei kritisch kranken Patienten (Hypalbuminämie) wurden Versuche im Zellkulturmedium realisiert. Das Blut eines gesunden Patienten besteht aus etwa 60 % Plasma. Bei Intensivpatienten z.B. mit akutem Leberversagen (ALV) liegt eine verminderte Konzentration Albumin (Hypalbuminämie) im Blutplasma vor. Ursachen dafür sind z.B. eine erhöhte kapillare Permeabilität, Hämodilution, renale Verluste oder verringerte hepatische Synthese [229]. Zusätzlich wurden Plasmaversuche unter der Verwendung von humanen Plasma aus dem selbst hergestellten Plasmapool von freiwilligen Spendern ohne Medikation realisiert, da Plasma die in vivo Situation eines gesunden Patienten besser widerspiegeln kann. Zudem wurden diese Versuche aufgrund der unterschiedlichen Plasma-Eiweiß-Bindung der

verschiedenen Antimykotika (vgl. 1.4 Tab. 4) verwendet. Die Protein-bindung gibt Auskunft, wie hoch der Anteil an Protein gebundenen Arzneistoff ist. Nur der freie Anteil eines Arzneistoffes ist pharmakologisch aktiv [230]. Als Bindungspartner kommen hauptsächlich Serumalbumin oder saures α 1-Glycoprotein in Frage. Die wichtigste Rolle bei der Arzneistoffbindung hat Albumin, welches hauptsächlich saure und neutrale Substanzen bindet, während an das saure α 1-Glycoprotein vorwiegend basische Arzneistoffe gebunden werden. Wenn die Arzneistoffmoleküle nicht an Plasmaproteine gebunden sind, sondern frei vorliegen, kann es aus dem Plasma zu seinem Wirkungsort diffundieren und dort seine Wirkung entfalten. Gebundene Arzneistoffmoleküle können nicht durch die Zellmembran diffundieren und sind dadurch pharmakologisch inaktiv. Ein gebundenes Arzneistoffmolekül kann weder metabolisiert noch ausgeschieden werden. Die Folge daraus kann eine Art Depotwirkung sein, da der Arzneistoff länger im Organismus verweilt. Die Höhe der Protein-bindung und somit auch des freien Anteils ist also variabel und demnach nicht einfach berechenbar. Dieses Phänomen ist für Ceftriaxon (Antibiotikum) gut untersucht. Dessen konzentrationsabhängige Bindung variiert zwischen 95 % bei niedrigen ($<100 \mu\text{g/ml}$), und 60 % bei hohen ($>400 \mu\text{g/ml}$) Konzentrationen [231].

Für die vorliegende Promotionsarbeit wurden intensivmedizinisch relevante Arzneimittelzubereitungen von Antimykotika hinsichtlich ihrer Wirkung auf die hepatozelluläre Zelllinie HepG2/C3A untersucht.

Wir konnten zeigen, dass Liposomales Amphotericin B (L-AmB) sich in unseren Analysen als potentiell hepatotoxisch in der klinischen relevanten Konzentration (C_{max}) im Medium und Plasma zeigte. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden Beeinträchtigungen hinsichtlich der Vitalität mit entsprechend erhöhter LDH-Freisetzung sowie erniedrigter mitochondrialer Aktivitäten bestimmt. Im Gegensatz dazu wurde durch die Inkubation mit L-AmB eine erhöhte Mikroalbuminsynthese bestimmt. Obwohl weder AmB noch die Lipidbestandteile keiner relevanten hepatischen Metabolisierung über CYP-Isoenzyme unterliegen, wurde eine erhöhte CYP1A2-Aktivität beobachtet. Bei dem neuen Parameter Apoptose wurden unauffällige Werte der frühen Apoptose hinsichtlich der CD95-Expression bestimmt. Signifikant höhere späte Apoptosezeichen wurden im Plasma beobachtet, während im Medium kaum DNA-Fragmentierungen stattgefunden haben. Durch die Konzentrationssteigerung wurde keine Verstärkung des hepatotoxischen Potenzials gezeigt. L-AmB besitzt eine Plasma-Eiweiß-Bindung von 84 %, aufgrund der Bindung lassen sich die Unterschiede zwischen den Medium- und Plasma-versuchsreihen erklären. Das hepatotoxische Potenzial ist im Medium ausgeprägter als im Plasma, da der gebundene Wirkstoff nicht im vollen Maße wirken konnte.

Der therapeutische Wert des Wirkstoffes AmB wird durch die hohe bekannte Systemtoxizität, insbesondere die Nephrotoxizität, aber auch Hepatotoxizität und infusionsbedingte Reaktionen,

stark eingeschränkt [232]. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UWA) und der Wirkmechanismus stehen unmittelbar im Zusammenhang mit der Struktur der Substanz und der Ähnlichkeit zu Cholesterol (in der Zellmembran menschlicher Zellen), Ergosterin (in der Zellmembran der Pilzzellen) und Sterinen. Die Affinität von AmB zu Cholesterin ist fast so hoch wie zu Ergosterin [119, 120, 233]. AmB als auch die Sterine besitzen ein planares hydrophobes, durchkonjugiertes Doppelbindungssystem von ähnlicher Länge. Durch die Bindung des lipophilen Molekülanteils an das Ergosterol in Pilzmembranen, kommt es zur Beeinträchtigung der Interaktion zwischen den Sterolen und Phospholipiden der Membran. Sie reagieren untereinander mit starken hydrophoben Wechselwirkungen. Die enge Anordnung wird durch die Anlagerung von AmB an die Sterine aufgelockert, was zur Permeabilitätsänderung der Membran und letztendlich zum Zelltod führt. Bestimmte Nierenzellen und Erythrozyten enthalten Sterole (primär Cholesterol), deshalb bindet AmB und es kommt ebenfalls zur Störung der Zellmembranpermeabilität [234]. Zusätzlich zu der Schädigung von Nierenzellen kommt es außerdem bei den Zellen der Immunabwehr, wie Makrophagen und B- und T-Lymphozyten zur Beeinträchtigung mit der Folge einer immunsuppressiven Wirkung [138]. AmB hat im Wirt potente immunomodulierende Eigenschaften [235–237]. L-AmB ist pharmakologisch inaktiv und wird zum Entfalten der Wirkung aus den Liposomen freigesetzt [238, 239]. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für den erhöhten therapeutischen Index. Nach Eintritt der Lipidformulierung in die systemische Zirkulation trennen Makrophagen Arzneistoff- und Lipidkonjugate und führen diese wieder zurück. Aufgrund der vermehrten Lokalisation der Makrophagen am Infektionsherd, kann eine gezielte Zufuhr zum infizierten Gewebe erfolgen [240]. Zudem dienen die phagozytierenden Zellen als Arzneistoffreservoir [240, 241]. Durch die lange Zirkulationszeit im Blut ist ein selektiver Transport zu den Pilzzellen möglich. Da kommt es zur Anhäufung der Liposomen am Infektionsherd, wo diese sich an die Pilzzelle heften und AmB direkt in die Zelle transferiert wird [112, 242, 243]. Allerdings kommt es trotz der langsamen Clearance von L-AmB zu einer Anreicherung in der Leber und der Milz [240]. AmB besitzt Affinitäten zu den verschiedenen Lipiden und Sterolen. Dabei scheint die Affinität zu Lipidmembranen in den Liposomen größer zu sein als zum Cholesterol in menschlichen Zellen, aber wiederum geringer als zum Ergosterol in den Pilzzellen [238, 239]. Weiterhin ist es von Vorteil, dass durch die Lipidzubereitungen die Freisetzung von Zytokinen verhindert wird. Zytokine fördern Toxizitätsreaktionen in menschlichen Zellen [244]. Eine zusätzliche Toxizitätsminderung liegt höchstwahrscheinlich in der Plasma-proteinbindung von AmB, denn AmB bleibt in Liposomen vorwiegend an HDL (High Density Lipoprotein) gebunden. An HDL gebundenes AmB kann weniger nephrotoxisch wirken als an LDL (Low Density Lipoprotein) oder freies AmB, da die Niere kaum HDL-Rezeptoren besitzt [112, 245].

In präklinischen und klinischen Versuchen zeigte sich das L-AmB als gleich wirksam gegen experimentelle Pilzinfektionen wie konventionelles AmB [241, 246]. Die Nebenwirkungen und

Unverträglichkeitsreaktionen vom konventionellen AmB sind auch unter L-AmB zu erwarten, jedoch in einem geringeren Ausmaß und reduzierter Häufigkeit, insbesondere die Nephrotoxizität. Die Sicherheit von L-AmB konnten in Studien gezeigt werden, da akute und infusionsbedingte Nebenwirkungen mit reduzierter Häufigkeit auftraten [247–249].

Bei der Testung der Triazole Fluconazol und Voriconazol zeigte sich die CYP1A2-Aktivität von Fluconazol-inkubierten Zellen im Medium und im Plasma unauffällig, während bei CYP3A4 eine geringfügige Erhöhung der Aktivität bestimmt wurde. Durch die Inkubation wurden mäßige Beeinträchtigung von Zellzahl und Vitalität mit entsprechend hoher LDH-Freisetzung im Medium und Plasma detektiert. Zudem konnten Beeinträchtigungen der mitochondrialen Dehydrogenasen durch die Inkubation mit Fluconazol gezeigt werden. Signifikant hohe DNA-Fragmentierungen wurden im Plasma beobachtet, während keine auffälligen CD95-Expressionen weder im Medium noch im Plasma festgestellt wurden. Fluconazol bindet nur 12 % der Plasma-proteine, deshalb wurden geringfügige Unterschiede zwischen Medium- und Plasmaversuchen bestimmt, mit Ausnahme der starken Mikroalbuminsynthese im Plasma. Es wurden keine Veränderung des hepatotoxischen Potenzials mit zunehmender Konzentration bestimmt.

Im Vergleich zu den anderen Antimykotika zeigte Voriconazol in den Untersuchungen das größte hepatotoxisches Potenzial. Ähnlich wie Fluconazol wurden Zellzahl und Vitalität der HepG2/C3A-Zellen durch die Inkubation mäßig beeinträchtigt. Bei der CYP1A2-Bestimmung im Medium wurden signifikant niedrige Aktivitäten bestimmt, während signifikant erhöhte Aktivitäten im Plasma ermittelt wurden. Die CYP3A4-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Die Bestimmung der Apoptose zeigte ähnliche Trends wie bei Fluconazol; CD95-Expressionen waren im Medium und Plasma unauffällig gering. Lediglich erhöhte DNA-Fragmentierungen wurden im Plasma beobachtet. Durch die Konzentrationssteigerung von Voriconazol wurde keine signifikante Erhöhung des Hepatotoxizitätspotenzial bestimmt. Voriconazol besitzt eine Plasma-Eiweiß-Bindung von 58 %. Das Medikament bindet vorwiegend an Albumin. Aufgrund dessen wurden Unterschiede zwischen den Medium- und Plasma-versuchen festgestellt. Generell zeigten die Plasmaversuche bessere Ergebnisse als im Medium. Unter anderem wurde eine starke Mikroalbuminsynthese im Plasma bestimmt.

Azole wirken durch die Hemmung der Biosynthese von Ergosterol fungistatisch. Über die Blockierung des Enzyms 14- α -Lanosteroldemethylase (ERG11), einem Enzym der CYP450-Gruppe, dessen Analogon in menschlichen Zellen an der Cholesterinsynthese beteiligt ist, erfolgt der Eingriff in die Ergosterol-Biosynthese [250, 251]. Die Wirkung beruht einerseits auf den Mangel an Ergosterol und andererseits in der Toxizität angereicherter Ergosterol-Vorstufen, durch Akkumulation von Lanosterol und anderen typischen Sterolen in der Zellmembran [252]. Dies führt zur Beeinträchtigung der Membranfunktion. Insbesondere membranständige Enzyme, die für das Zellwachstum und -teilung notwendig sind, wie z.B. die Chitinsynthase, werden gestört

[253]. Einerseits werden die Triazole durch CYP450-Enzyme verstoffwechselt und andererseits hemmen auch manche dieser Enzyme. Die metabolische Elimination der Triazole erfolgt in unterschiedlichem Ausmaß durch CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 oder Glucuronidierung. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das in dieser Arbeit verwendete Fluconazol. Es gehört zur ersten Generation der Triazole und ist ein starker Inhibitor des hepatischen oxidativen Enzyms CYP2C9 und ein schwacher Inhibitor des Isoenzym CYP3A4, über das es auch verstoffwechselt wird [254]. Trotz des relativ verbesserten Sicherheitsprofils, induziert Fluconazol mehrere seltene, aber schwere Nebenwirkungen, wie Hepatotoxizität [139]. Der Wirkstoff ist hepatotoxisch [235, 255]. Die häufigsten klinischen Präsentationen Fluconazol induzierter Hepatotoxizität sind leicht bis moderate, reversible und asymptomatische Zytolyse [256, 257]. Dennoch sind Fälle von schwerer Übelkeit und Erbrechen [139], Gelbsucht [139, 258], schwere Cholestase [259], oder tödliche akute Lebernekrose [139, 260] bekannt. Jedoch ist der Mechanismus der Azol-induzierter Hepatotoxizität weitgehend unbekannt [261]. Auch wenn Fluconazol sich als ein potenter CYP450-Inhibitor gezeigt hat, wird es nicht in der Leber metabolisiert und wird ohne Veränderung über die Nieren ausgeschieden [262]. CYP450 hat eine geringe Schlüsselrolle bei der Hepatotoxizität. Guillaume et al. vermuten, dass Fluconazol-induzierte Hepatotoxizität mit der Hemmung der CYP450-Enzyme in der inneren Mitochondrien-membran und glattes Endoplasmatisches Retikulum der Hepatozyten zusammenhängt und dies zu mitochondrialen Erkrankungen führt [259]. Zudem vermuten wenige Studien, dass nicht identifizierte toxische Metabolite, die während der Flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) Stoffwechsel der Azol-Antimykotika in der Leber entstehen, verantwortlich für die Azol-induzierte Hepatotoxizität sind [232, 263, 264].

Fluconazol wird zu 80 % über Nieren ausgeschieden. Nierenbeeinträchtigungen können zu einer Akkumulation von Fluconazol im Körper führen. In Folge dessen kann es zu einer dosisabhängigen Hepatotoxizität kommen [258, 260]. Bronstein et al. beschrieben eine dosisabhängige Hepatotoxizität von Fluconazol, die innerhalb von 10 Tagen nach oraler Einnahme von 400 mg pro Tag bei einem Nierenpatienten auftrat [260]. Crerar-Gilbert et al. schilderten einen weiteren Fall der dosisabhängigen Fluconazol assoziierten Hepatotoxizität bei einem Patienten mit akutem Nierenversagen. Dabei erhielt die Patientin für 25 Tage täglich orale Dosis von 400 mg Fluconazol [265].

Voriconazol, Azol der zweiten Generation, wird in der Leber über N-Oxidation durch die CYP450-Isoenzyme vor allem durch CYP2C19 und zu einem geringen Grad durch CYP2C9 und CYP3A4 metabolisiert und anschließend in Form überwiegend inaktiver Metabolite zu etwa 80 % im Urin ausgeschieden [266, 267]. Klinisch manifeste Hepatotoxizität durch Voriconazol ist selten, kann aber häufiger als mit Fluconazol und Itraconazol auftreten. Einzelne Studien für Voriconazol zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhten Serumspiegeln und dem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen [145, 268]. So zeigte in einer Studie von 52 Patienten bei

Plasmakonzentrationen über 5,5 mg/l eine signifikante Zunahme an neurologischen Nebenwirkungen (Sehstörung) und auch eine erhöhte Rate an hepatischer Cholestase. In klinischen Studien mit Voriconazol kam es gelegentlich zu Fällen schwerer Leberfunktionsstörungen (einschließlich Hepatitis, Cholestase und fulminanten Leberversagens, auch mit tödlichem Ausgang). Ein wesentlicher Faktor für die Schwankung der Spiegel liegt in der hepatischen Metabolisierung. Aufgrund der typischen CYP-Isoenzyme resultiert ein breites Spektrum an potenziell interagierenden Medikamenten. Der CYP2C19-Polymorphismus und die nicht-lineare ungesättigte Pharmakokinetik kann eine hohe Variabilität der Pharmakokinetik von Voriconazol verursachen [269–271]. Dabei können schnelle, mittlere, und langsame Metabolisierer differenziert werden. Eine mittlere Enzymaktivität führt zu einer Verdoppelung und eine langsame zu einer Vervielfachung der Voriconazol-Konzentration. Dies kann einen Anstieg in den gewünschten Bereich oder ebenso in einem Bereich mit erhöhter Toxizität bedeuten. Die Verteilung des Polymorphismus ist stark von der ethnischen Zugehörigkeit abhängig. In Europa gehören etwa 2-5 % zum langsamen Metabolisierungstyp, während etwa 20 % der asiatischen Bevölkerung dazugehören [272, 273]. Zudem ist das polymorphe Enzym CYP2C19 vor allem für die Umwandlung in den inaktiven Hauptmetaboliten N-Oxid verantwortlich, das 72 % der Plasma-Metaboliten ausmacht. Jedoch ist nichts über die Rolle des Metaboliten hinsichtlich des hepatotoxischen Potenzials von Voriconazol bekannt [274, 275]. Als Lösungsvermittler enthält Voriconazol die intravenöse Formulierung ein Cyclodextrin (SBECD). Bei eingeschränkter Nierenfunktion besteht die Gefahr der Akkumulation, so dass in diesem Fall die orale Darreichungsform bevorzugt werden sollte [122].

Eine relativ neue bei invasiven Candida-Infektionen eingesetzte Gruppe semisynthetischer Antimykotika sind die Echinocandine. Aktuell sind Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin zugelassen. Anidulafungin nimmt eine Sonderstellung ein, da der Wirkstoff nicht metabolisiert wird und die längste biologische Halbwertszeit in dieser Gruppe hat. Im Rahmen der Hepatotoxizitätstestung in der klinisch relevanten C_{\max} -Konzentration zeigte sich Anidulafungin im Medium und im Plasma geringfügig hepatotoxisch. Durch die Inkubation wurden Beeinträchtigungen hinsichtlich der Vitalität mit einhergehender erhöhter LDH-Freisetzung und reduzierte mitochondrialer Aktivität beobachtet. Obwohl bei den Echinocandinen bei Überdosierungen keine toxischen Wirkungen bei gesunden Patienten bekannt sind [276], wurden bei Anidulafungin bei den Analysen starke konzentrationsabhängige Beeinträchtigungen im Medium und mäßige im Plasma bestimmt. Bei allen Parametern wurde deutlich, dass Anidulafungin in höheren Konzentrationen antiproliferierende Effekte und Zytolyse auf die Hepatozyten besitzt. Zudem wurde durch die Konzentrationssteigerung die Mikroalbuminsynthese im Medium stark beeinträchtigt. Während mit zunehmender Konzentration die Anzahl der CD95-Expressionen abnahm, stieg die Anzahl der DNA-Fragmentierung. Durch die Inkubation mit Anidulafungin in höheren Konzentrationen wurden

apoptotische Signale ausgelöst. Auffällig waren die starke konzentrationsabhängige Steigerung der CYP3A4-Aktivität im Medium und eine mäßige Zunahme im Plasma, obwohl Anidulafungin nicht hepatisch abgebaut wird. Jedoch ist das Isoenzym CYP3A4 nicht ausschließlich in den Hepatozyten lokalisiert. Bei der CYP1A2-Aktivität wurden keine Beeinträchtigungen bestimmt. Aufgrund der hohen Plasma-Eiweiß-Bindung von 99 % kann das unterschiedliche hepatotoxische Potenzial in Medium und Plasma erklärt werden. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu Plasmaproteinen, wurden deutlich höhere Beeinträchtigungen im Medium detektiert.

Caspofungin ist in allen Konzentrationen wenig hepatotoxisch. Es wurden geringfügige Beeinflussungen hinsichtlich sämtlicher Parameter im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet. Bei den CYP1A2- und CYP3A4-Aktivitäten wurden weder Induktion nach Inhibition im Medium oder Plasma bestimmt. Obwohl Caspofungin eine hohe Plasma-Eiweiß-Bindung (97 %) besitzt, wurden kaum signifikante Unterschiede hinsichtlich der Medium- und Plasmaversuche bestimmt. Mit Ausnahme der höheren Mikroalbuminsynthese und der höheren Anzahl DNA-Fragmentierungen im Plasma.

Im Vergleich zu den Azolantimykotika wie z.B. Fluconazol haben die Echinocandine günstige pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften und sind gut verträglich [277]. Sie bieten einen völlig neuen Ansatz, in dem sie nicht wie AmB und Azole an der Zellmembran, sondern an der Zellwand der Pilze angreifen, in dem sie die (1,3)- β -Glukansynthetase inhibieren. Sie zeigen durch ihren Wirkmechanismus ein vergleichbar geringes Interaktions-potential und sind im Vergleich zu AmB weniger nephro- und hepatotoxisch [118, 278, 279]. Sie weisen keine durch den Wirkmechanismus bedingten Toxizitäten auf, da es für die Targets an der Zellwand der Pilze kein Analogon in menschlichen Zellen gibt [280–282]. Es treten keine renalen und wenig hepatische Toxizitäten auf. Da die Echinocandine eine hohe Proteinbindung von bis zu 99 % aufweisen, befindet sich nur ein geringer Anteil an freiem Arzneistoff im Blut [278, 283]. Die verschiedenen Echinocandine unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur. Alle besitzen eine gemeinsame Ringstruktur, jedoch unterscheiden sie sich in der Seitenkette, was zum unterschiedlichen pharmakologischen Verhalten führt. Anidulafungin fällt durch eine stabilere Ringstruktur und eine lipophile Seitenkette auf. Diese Besonderheiten resultieren in einer längeren biologischen Halbwertszeit, fehlender hepatischer Metabolisierung, größerem Verteilungsvolumen und potenter antifungaler Wirkung. Anidulafungin ist kein klinisch relevantes Substrat, kein Induktor oder Hemmer von CYP450-Isoenzymen [284]. Des Weiteren ist Anidulafungin weitgehend unabhängig von Organfunktionen und wird durch eine nicht-enzymatische hepatische Degradation abgebaut. Wie auch in anderen Studien dargestellt, wurden in der Bestimmung der CYP1A2-Aktivität keine Interaktionen in den Ergebnissen beobachtet. Jedoch ist zu beachten, dass diese in vitro-Studien mögliche Wechselwirkungen in vivo nicht vollständig ausschließen können. Generell wird die Pharmakokinetik von Anidulafungin nicht von der Leberfunktion beeinflusst [150]. Zwischen Patienten mit normaler Leberfunktion und

solchen mit leichter, mäßiger oder schwerer Leberinsuffizienz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede beim Anidulafungin-Plasmaspiegel (AUC). Allerdings wurde für Anidulafungin eine vernachlässigbare renale Clearance ($<1\%$) nachgewiesen [285]. Weiterhin ist bekannt, dass es zur Akkumulation von Anidulafungin in der Leber kommen kann. In präklinischen in vivo Studien (Ratte, Affe) wurden bei Dosierungen, die um das 4- bis 6-fache über der erwarteten klinisch-therapeutischen Exposition lagen, Hinweise auf eine Lebertoxizität, einschließlich erhöhter Leberwerte und morphologischer Veränderungen, beobachtet werden [286]. Aktuell zeigen diese Aussagen keinen Zusammenhang mit den genannten Eigenschaften bei der Anwendung von Anidulafungin in der Klinik. Weitere Einschränkung könnte die fertige Zubereitung von Anidulafungin darstellen, da zur Lösungsvermittlung des Wirkstoffes 24 Vol % Ethanol enthalten sind. Dies entspricht 6 g Ethanol in der Erhaltungsdosis von 100 mg bzw. 12 g Ethanol in der Initialdosis von 200 mg. Deshalb sollte der Ethanolgehalt in der Nutzen-Risiko-Bewertung vor allem bei alkoholabhängigen Patienten, Schwangeren, sowie Patienten mit Leberschäden oder Epilepsie berücksichtigt werden [287]. Bisher waren keine nennenswerten Nebenwirkungen durch den Alkohol festzustellen. Allerdings gibt es kaum Berichte, die diesen Aspekt in Zusammenhang mit Anidulafungin beleuchten. Entscheidend ist sicher, dass das Medikament sehr langsam infundiert wird und es somit zu keinen relevanten Alkoholspiegeln kommen sollte. In Zukunft soll von der Herstellerfirma (Pfizer) eine ethanolfreie Formulierung eingeführt werden [288].

Im Unterschied zu Anidulafungin wird Caspofungin in geringem Umfang über das CYP-System hepatisch metabolisiert. Dabei wird Caspofungin in der Leber durch Peptid-Hydrolyse und N-Acetylierung hauptsächlich in inaktive Metabolite verstoffwechselt und zerfällt auch spontan in inaktive Produkte, welche protrahiert über einige Tage mit der Galle ausgeschieden werden [289, 290]. In der Literatur werden keine mit dem Wirkmechanismus assoziierten Toxizitäten beschrieben. Aufgrund der nicht-linearen Pharmakokinetik mit einer zunehmenden Akkumulation bei Dosissteigerung, können jedoch hepatische Beeinflussungen nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der nicht vorhersehbaren Wirkspiegel und trotz der geringen Toxizität von Echinocandinen, ist eine detaillierte Überwachung der Leberparameter und des Echinocandinspiegels vor allem bei höheren Dosierungen zur sicheren Therapie von invasiven Pilzinfektionen sinnvoll.

Zur Prüfung der Zytotoxizität wird von der ISO Norm 10993-5 die Verwendung von folgenden Zelllinien empfohlen: z.B. CCL 1 - NCTC clone 929 (Fibroblasten aus der Maus), CCL 171 - MRC-5 (Fibroblasten aus einer menschlichen Lunge), CCL 10 – BHK-21[C13] (Fibroblasten aus der Niere eines Syrischen Goldhamsters) und V79-379A (Fibroblasten aus der Lunge eines Chinesischen Zwerghamsters) [79]. Jedoch sind die meisten Zelllinien hauptsächlich tierischen Ursprungs. Die einzige Zelllinie humanen Ursprungs entstammt der Lunge. Das Zielorgan für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Antimykotika war die Leber, die bei der Metabolisierung der

Wirkstoffe von großer Bedeutung ist. Daher wurde zur Überprüfung der Hepatotoxizität anstelle der empfohlenen Zelllinien die humane Tumorleberzelllinie HepG2/C3A von der ATCC® CRL-10741™ verwendet. HepG2/C3A ist eine immortalisierte Hepatozytenzelllinie humanen Ursprungs mit epithelartiger Zellmorphologie [291]. Die Zelllinie besitzt noch viele Funktionen, z.B. Sezernierung von wichtigen Plasmaproteinen, die für humane Hepatozyten typisch sind [292]. Außerdem besitzen HepG2/C3A-Zellen die Fähigkeit Glykogen zu bilden, wenn genügend Glucose im Kulturmedium vorhanden ist, sowie die Produktion von Kollagen I, III und IV [293]. In der Wachstumsphase vor dem Konfluieren verhalten sich die HepG2/ C3AZellen ähnlich dem sich regenerierendem Lebergewebe. Sie können „unbegrenzt“ kultiviert werden und wachsen auf Substratoberflächen adhärent und epithelähnlich als Monolayer-Kultur. Sie besitzen einen stabilen Phänotyp in Kultur und sind deshalb leicht zu standardisieren [93]. Die Zelllinie weist nicht das vollständige Spektrum fremdstoffmetabolisierender Enzyme der ursprünglichen Leberzellen auf [294]. Die Zelllinie besitzt unter Standardbedingung etwa 10-20 % der gesamten CYP-Aktivität im Vergleich zu primär isolierten Hepatozyten. Phase I-Enzyme (CYP1A, 2B, 2C, 3A) und Phase II-Enzyme (z.B. Sulfotransferase) konnten in geringer Aktivität nachgewiesen werden [295, 296]. Jedoch können gezielt bestimmte Isoenzyme durch Substanzen wie Methylcholanthren, Dexamethason, Rifampicin induziert werden, wodurch die Enzymaktivität deutlich erhöht werden kann [296–299]. Aufgrund guter Charakterisierung biochemischer und metabolischer Eigenschaften von primären Hepatozyten können Bedingungen abgeleitet werden, die eine in vitro generierte Hepatozyten-ähnliche Zelle für unterschiedliche Fragestellungen erfüllen müssen [91, 300]. Unter Berücksichtigung der beschränkten Enzymaktivität und Induktionsfähigkeit stellen HepG2/ C3A-Zellen in pharmakologischen und/oder toxikologischen Studien eine etablierte und oft genutzte Zelllinie dar [167, 170]. So zeigten sich HepG2/C3A als nutzbare Indikatoren z.B. bei Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung Cadmium in Leberzellen [170]. Weitere Anwendung fand die Zelllinie im bioartificialen hybriden Leberunterstützungssystem. ELAD (Extracorporeal Liver Assist Devices) ist ein extrakorporales biologisches Kreislauf-System zur temporären Unterstützung oder auch Übernahme der kompletten Leberfunktionen unter Verwendung der Zelllinie HepG2/C3A [301, 302]. Es wurde beobachtet, dass das System Toxine verarbeitet und Proteine sowie Metaboliten synthetisiert [303].

In einer umfangreichen Studie (The Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity – MEIC) zeigten in vitro Zytotoxizitätstests zwar eine Spezifität zur Vorhersage arzneimittel-induzierter Lebertoxizität von mehr als 90 % auf, jedoch lag die Sensitivität meist bei ≤ 10 % [304]. Dabei lag die Sensitivität der regulatorischen Tierstudien ebenso nur bei 52 %. Zudem wurde in einer retrospektiven Studie, in der bei 150 Prüfsubstanzen Tierversuchsdaten mit klinischen Daten verglichen wurden, gezeigt, dass die Tierversuche nur in etwa 43 % der Fälle die humane Toxizität richtig voraussagen konnten [305]. Durch die Kombination verschiedener Zytotoxizitätsparameter in vitro konnte die Spezifität und die Sensitivität auf mehr als 90 % gesteigert

werden [306, 307]. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, schreiben die Normen keine bestimmten Tests für die Zytotoxizitätsprüfung vor, stattdessen werden eine Reihe von Messparametern (z.B. Zellschädigung (Laktat-Dehydrogenase (LDH), Apoptose), metabolische Aktivität (CYP-Aktivität), Zellfunktionen (Mikroalbumin-bestimmung)) sowie allgemeine Viabilitätstests (z.B. Tetrazoliumbasierte MTT- und XTT-Assay, Neutralrot-Test) empfohlen. Insgesamt gibt es eine große Anzahl von Testmethoden durch die verschiedene Ergebnisse für die gleiche Substanz resultieren können, da häufig nur wenige der oben genannten Parameter hinzugezogen werden. Dies verlangt in Zukunft nach standardisierten Testmethoden mit dem Ziel der Reproduzierbarkeit.

Im Rahmen der Promotion wurde ein breites Spektrum an unterschiedlichen Parametern zur Bestimmung der Hepatotoxizität *in vitro* verwendet. Es wurden Bestimmungen der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung, der Funktionalität (Bestimmung von Mikroalbumin, CYP-Aktivität, mitochondriale Dehydrogenasen-Aktivität), sowie der Zytoplasmamembranintegrität (Freisetzung von LDH) der Zellen durchgeführt. Zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen wurden REM- und TEM-Aufnahmen erstellt, sowie die Live/Dead-Färbung zur Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen und kinetische Verlaufs-Aufzeichnung mittels Live Cell Imager. Dabei lag der Fokus auf der Detektion einer akuten Toxizität.

Veränderungen in der Membranpermeabilität zählen zu den wichtigsten Schäden nach Inkubation mit hepatotoxischen Substanzen. Als klassischer Routinetest in der Zellkultur sowie im Rahmen von toxikologischen Untersuchungen hat sich der Trypanblau-Ausschlusstest bewährt [166]. Die indirekte Methode der Vitalitätsbestimmung setzt voraus, dass avitale Zellen die Integrität der Zellmembran sowie das Plasmamembranenpotenzial verlieren. Jedoch können die Ergebnisse verfälscht werden, wenn apoptotische Zellen aufgrund veränderter Membran als vital erkannt werden [165]. Vollständig degenerierte Zellen können durch den Trypanblau-Test nicht erfasst werden, da der Farbstoff nicht in den Zellen bleibt. Andererseits kann Trypanblau als toxischer Farbstoff vorgeschädigte Zellen abtöten und somit ebenfalls das Ergebnis verändern. Zu weiteren Verfälschungen können Wechselwirkungen mit Proteinen führen [308–310]. Der Trypanblau-Ausschlusstest wurde verwendet, weil mit ihm auch eine Zellzählung möglich war. Allerdings mussten die Zellen ausgezählt werden und konnten nicht photometrisch vermessen werden. Um die Toxizität vollständig zu definieren, war es im Rahmen dieser Arbeit notwendig auch die Anzahl lebender Zellen zu bestimmen.

Die Bestimmung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität lebender Zellen wurde mittels XTT durchgeführt. Die ISO Norm 10993-5 empfiehlt die Verwendung eines Tetrazoliumbasierten Zytotoxizitätsassay wie MTT oder XTT für die quantitative Ermittlung der Zytotoxizität [79, 200]. Weiterhin eignet sich XTT für das Screening von anti-HIV-Drogen [311], für die Bestimmung der Zellschädigung bei Pilzen z.B. durch Antimykotika [312], für die Quantifizierung von TNF- α im Bioassay [313] und findet Anwendung im Bereich der Immunologie, Krebsforschung oder bei

Biokompatibilitätsuntersuchungen [314–316]. Der XTT-Test misst den Einfluss von Fremd-stoffen auf die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität. In lebenden Zellen wird durch die aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen das Tetrazolium-Salz XTT in ein oranges lösliches Formazan umgewandelt. Löst eine applizierte Substanz eine zytotoxische Reaktion in den Zellen aus, ist dies mit einem proportionalen Abfall der Enzymaktivität verbunden. Vollständig inhibierte intramitochondriale Dehydrogenasen können kein Formazan aus XTT bilden. Vorteile des XTT-Testes sind Genauigkeit und Reproduzierbarkeit [197, 317, 318]. Zu bedenken ist jedoch, dass auch das Substrat XTT gewisse toxische Eigenschaften hat. In einer Studie konnte nachgewiesen, dass XTT morphologische Veränderungen an den HaCaT-Zellen verursachte [319].

Die Messung der Lactatedehydrogenase (LDH) gilt als ein etablierter Endpunkt in toxikologischen Untersuchungen [320, 321]. Zudem wird LDH als diagnostischer Parameter bei hämatologischen Erkrankungen, bei Muskelerkrankungen und bei Leber- und Gallenwegserkrankungen verwendet [322]. LDH ist ein ubiquitär vorkommendes intrazytoplasmatisches Enzym, welches eine Schlüsselstellung im anaeroben Stoffwechsel der Zelle einnimmt. Bei intakten Zellen ist LDH streng intrazellulär [323]. Eine verstärkte Freisetzung von LDH aus den Mitochondrien in das Zellkulturmedium ist ein unspezifischer Hinweis für Zellschädigung und -untergang. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand (Medium/Plasma). Das lässt darauf schließen, dass Zellmembranschädigungen durch Permeabilitätsstörungen bzw. Zelllyse mit zugrunde liegendem Zelltod bei Spätaoptose oder Nekrose vorliegen [324]. Rückschlüsse auf die Art des Zelluntergangs können jedoch nicht definiert werden, da die Gesamtmenge von LDH gemessen wurden. Der Normalwert für die LDH-Aktivität liegt bei 120 bis 240 U/l im Blutserum (nach der optimierten Standardmethode der DGCK). Dieser resultiert aus der täglichen Zellmauserung. Die Zelle ist zur physiologischen Regeneration befähigt, da Leberzellproliferation und Leberzelluntergang im Gleichgewicht sind. Diese Homöostase wird auch als „physiologische Apoptose“ bezeichnet [325]. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6). Die Werte von Tag 3 dienten zur Vorüberprüfung, um bei sehr hohen LDH-Werten gegebenenfalls den Testablauf anzupassen, sowie erste Hinweise auf das hepatotoxische Potenzial zu erhalten.

Der Nachweis der Syntheseleistung des leberspezifischen Parameters Albumin kann als etablierte Methode zur Beurteilung und Überwachung von Zellkulturen in Metabolismus- und Toxikologiestudien verwendet werden [216]. Die Albuminsynthese findet ausschließlich in der Leber und dort in den Hepatozyten statt. Diese wird von Insulin und Glucokortikoiden sowie anderen Hormonen beeinflusst. Die tägliche Syntheserate eines Erwachsenen beträgt 150 bis 250 mg/kg Körpergewicht, dafür werden etwa 12 bis 20 % der Proteinsynthesekapazität der Leber benötigt [326]. Deshalb gilt die Albuminsynthese als wichtiger Parameter für die Leber-funktion.

Insbesondere die Sekretion von Albumin ist ein Zeichen für einen stoffwechselaktiven Zustand der Hepatozyten [327].

Die Ermittlung der fremdstoffmetabolischen Aktivitäten der antitumorkomplex-behandelten HepG2/C3A-Zellen erfolgte über die quantitative Erfassung des Umsatzes von Modellsubstanzen. Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP1A2 wurde der Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Assay (EROD-Assay) verwendet [163, 186]. Bei dem kinetischen Verfahren wird das künstliche Substrat 7-Ethoxyresorufin, hohe Spezifität für CYP1A2, durch das Enzym 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase in das messbare fluoreszierende Endprodukt Resorufin deethyliert [328, 329]. Im Rahmen zytotoxikologischer Untersuchungen und Studien wurde die EROD-Aktivität für polychlorierte Biphenyle (PCB) in primären Rattenhepatozyten beschrieben [330]. Zudem wurde eine dämpfende Wirkung des Schwermetalls Cadmium auf die EROD-Aktivität durch Feldbeobachtungen in vivo an Flundern bestätigt [331].

Die Präsenz von CYP1A2 scheint beim Menschen ausschließlich auf die Leber beschränkt zu sein. Etwa 18 % des gesamten Cytochromgehaltes wird durch CYP1A2 dargestellt [332, 333]. HepG2-Zellen weisen insgesamt eine geringe CYP-Aktivität bei Fremdstoff-Biotransformation auf. Doostar et. al zeigte, dass der Umsatz von 7-Ethoxyresorufin durch unbehandelte Hepatozyten mit modifiziertem Earl's Medium 72 h annähernd konstant niedrig verläuft [334]. Eine Aktivitätssteigerung von fast 700 % über 72 h im Vergleich zum Ausgangswert wurde durch Induktion mit 3-Methylcholanthren (3-MCH) für humane Hepatozyten gezeigt [291] und aufgrund dessen bei unseren Untersuchungen durchgeführt. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie 3-MCH, induzieren vor allem CYP Isoenzyme der Familie I. Die Enzyminduktion geht ohne Hypertrophie des endoplasmatischen Retikulums vonstatten. 3-MCH, möglicherweise auch ein Metabolit, bindet in der Zelle an einen zytosolischen Rezeptor. Dieser wiederum wird in den Zellkern geschleust und führt dort zu einer Derepression der CYP I-Gene und damit zu einer verstärkten Bildung der entsprechenden mRNA. Daran schließt sich eine erhöhte Synthese der Enzyme an [184, 335]. In der Zellkultur sind die CYP-Aktivitäten abhängig von der Zusammensetzung des Mediums, sowie durch Zusätze von Serum, Hormonen und Wachstumsfaktoren [334, 336, 337]. Nyberg et al. fanden heraus, dass die verwendete FKS-Konzentration Einfluss auf die CYP-Aktivitäten in HepG2-Zellen hat [338]. Niedrig konzentriertes Serum kann die CYP-Aktivität in HepG2-Zellen stark verringern [334]. Wobei die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-Odeethylase innerhalb von 72 h anstieg. Deshalb wurden die Testzellen für den Ethoxyresorufin-Ansatz mit 15 % FKS kultiviert. Neben der Induktion mit gesteigerten Aktivitäten kann jedoch auch eine Hemmung des CYP z.B. durch verschiedene Xenobiotika beobachtet werden. Dafür können unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein, z.B. die Herstellung veränderter CYP mit geringerer Aktivität, die Hemmung der Enzymsynthese oder auch der kompetitiven oder irreversiblen Hemmung der CYP selbst [339].

Zum Ansetzen der Arbeitslösungen wie 3-MCH, Ethoxyresorufin, Resorufin wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von weniger als 0,5 % als Lösungsmittel eingesetzt. Diese führten bei den Hepatozyten nicht zu toxischen oder proliferations-hemmende Erscheinungen. Stattdessen stabilisiert DMSO in Hepatozyten sowohl die CYP-Aktivität als auch die Aktivitäten der Phase-II-Reaktionen [340, 341]. Weiterhin beeinflusst das verwendete Lösungsmittel die Umsatzrate z.B. von 7-Ethoxyresorufin. Laut Untersuchungen von Muehlenfeld et al. wurde die höchste Aktivität in dem DMSO gelöstem 7-Ethoxyresorufin bestimmt. Andere Lösungsmittel wie Methanol, Aceton oder Ethanol bewirkten eine Verringerung des Umsatzes [291].

Zusätzlich zu den leberspezifischen Standardparameter CYP1A2 wurde die CYP3A4-Aktivität bestimmt, weil die CYP3-Familie für den Fremdstoffmetabolismus ebenfalls von großer Bedeutung ist. Im Unterschied zum leberspezifischen Isoenzym CYP1A2 ist CYP3A4 nicht nur in den Hepatozyten, sondern auch in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert. CYP3A4 ist mit 70 % der dort befindlichen CYP-Enzyme maßgeblich an den enteralen First-Pass-Metabolismus von Arzneistoffen beteiligt. CYP3A4 metabolisiert über die Hälfte aller therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe z.B. Verapamil, Midazolam, Dexamethason [342]. Die CYP3A4-Aktivität wurde in einem 3D-Leberzellbioreaktor unter Verwendung von HepaRG-Zellen als spezifische Aspekte der Biotransformation untersucht. Dieses Modell zeigt gute Anwendung für toxikodynamische Untersuchungen sowie in toxikologischen Studien [343]. CYP3A4 ist die dominierende Isoform innerhalb der Leber mit einem durchschnittlichen Anteil von 30 % der gesamten CYP-Proteinkonzentration. Es besitzt ein breites Substratspektrum, da sowohl relativ kleine Substanzen wie PCM mit einem Molekulargewicht von 151 g/mol, als auch große wie Ciclosporin mit einem Molekulargewicht von 1203 g/mol verstoffwechselt werden. Im Gegensatz zu anderen CYP-Enzymen, wie CYP2D6 wird CYP3A4 als ein Isoenzym mit hoher Kapazität und niedriger Affinität bezeichnet, so dass CYP3A4 hauptsächlich Arzneistoffe in hoher Konzentration verstoffwechselt. CYP3A4 debenzyliert bevorzugt das Substrat 7-Benzyl-oxy-4-trifluormethyl-cumarin (BFC) zu 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC), aufgrund dessen wurden die Analysen mit dem Cumarinderivat durchgeführt. Wird dieses Isoenzym inhibiert, übernehmen Isoenzyme mit niedriger Kapazität und hoher Affinität (z. B. CYP2D6) die Aufgabe des Fremdstoffmetabolismus. Aufgrund der geringen Kapazität der Isoenzyme, steigt die Blutkonzentration und es kann zu toxischen Nebenwirkungen kommen.

Der konkrete Vergleich der Ergebnisse, insbesondere auch mit Aussagen aus der Literatur wird z.B. durch die unterschiedliche Wahl von Kulturmedium und Kulturformen erschwert. Die methodischen Modifikationen sind sehr vielfältig. Grundsätzlich sollten die Einzelenzyme charakterisiert und verglichen werden, die die gleiche oder zumindest ähnliche Substratspezifität besitzen. Ferner sollten zwischen Basisaktivität, bedingt durch das Vorhandensein konstitutiver Enzyme, sowie der durch Induktion hervorgerufener enzymatischer Aktivität differenziert werden [291].

Morphologische Veränderungen an der Zelle spielen eine große Rolle bei zytotoxikologischen Untersuchungen [319]. In dem hier vorgestellten Zytotoxizitätstest erfolgte keine statistische Auswertung der durchgeführten Live/Dead-Färbungen, REM-, TEM- und Live Cell Imager-Aufnahmen, die Tests dienten in dieser Arbeit unter dem Verwendungszweck der Bilddokumentation und qualitativen Beschreibung.

Beim Live/Dead-Assay lässt sich die toxische Wirkung aus dem Verhältnis vitaler und avitaler Hepatozyten semiquantitativ ermitteln. Im Fall toxischer Beeinflussung fungiert die Zellmembran nicht mehr länger als selektive Barriere zwischen Zelle und Umgebung. Daher bietet der Nachweis einer intakten bzw. geschädigten Zellmembran eine schnelle und praktische Methode zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen [344]. Die Vitalfärbung ist eine gute Methode, um das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen innerhalb kürzester Zeit visuell zu bestimmen. Dieses System ist bereits erfolgreich zur Bestimmung der Vitalität von Bakterien im Gastrointestinaltrakt eingesetzt worden [94]. Aufgrund der limitierten Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe ist die Anzahl der zu detektierenden Wells begrenzt. Ein hoher Probendurchsatz ist mit der Analyse nicht möglich.

Die Analyse von Zellen mithilfe von Mikroskopie ist zum Verständnis von Struktur und Funktion unerlässlich. Die unterschiedlichsten elektronenmikroskopischen Methoden gehören mittlerweile neben den klassischen lichtmikroskopischen Untersuchungen zu den bildgebenden Routineverfahren. Der wesentliche Vorteil gegenüber der Lichtmikroskopie besteht vor allem in der Steigerung des Auflösungsvermögens (höheren Vergrößerungen, höherer Auflösung, viel größerer Tiefenschärfe). Experimentelle induzierte oder pathologische Veränderungen lassen sich beim bloßen Betrachten von REM-Bildern oftmals kaum quantitativ erfassen [345]. Durch die Erzeugung von Schnittbildern bei TEM-Aufnahmen kommt es zum Verlust der räumlichen Informationen. Die aufwendige Probenpräparation, welche zur Veränderung bzw. Zerstörung der Probe sowie zur Artefaktbildung auf der Probenoberfläche führen kann, ist von Nachteil. Dadurch können Strukturen entstehen, die nur durch die Vorbereitung entstanden sind und nichts mit dem eigentlichen Objekt zu tun haben. Die Auswertung der Bilder kann demzufolge erschwert sein und stellt einen zeitraubenden und somit limitierenden Faktor in Forschungsarbeiten dar. Zur visuellen Darstellungen waren die Aufnahmen sehr hilfreich. Sie müssen aber nicht immer Bestandteil der Analyse der Toxizität sein.

Durch die Live Cell Imager Aufnahmen konnte der zeitliche Verlauf von den toxischen Beeinflussungen von den Antimykotikazubereitungen während der Inkubation im Brutschrank beobachtet werden. Es konnten unterschiedlich starke Auswirkungen der verschiedenen Antimykotikazubereitungen auf die Zellen gezeigt werden. Allerdings konnte aufgrund der individuellen Lokalisation der 24-Well-Platte auf dem Live Cell Imager keine einheitliche Betrachtung durchgeführt werden, so dass unterschiedliche Bereiche im Well zur Analyse herangezogen wurden. Aufgrund der Limitation der Aufnahme von einem Well konnte der Fokus

pro Versuchsreihe nur auf eine Konzentration gelegt werden, so dass viele Zeitanalysen durchgeführt werden mussten, um eine hepatotoxische Beurteilung über die Zeit zu definieren. Insgesamt waren die Aufnahmen hilfreich zur Definition vom Zeitpunkt der Schädigung sowie des Ausmaßes; zur quantitativen Auswertung können die Ergebnisse jedoch nicht verwendet werden.

Zur Erweiterung der Parameter des Hepatotoxizitäts-Assays wurden Bestimmungen zur Apoptose etabliert. Humane Leberzellen reagieren sehr sensibel auf proinflammatorische und toxische Reize. Aufgrund dessen können durch Apoptose-Assays zuverlässige Aussagen bezüglich exogener, aber auch endogener Toxizität gemacht werden [346, 347]. Denn Wirkungen, die über einen physiologischen Schwankungsbereich hinausgehen, führen zum Tod der Zellen. Diese können nekrotisch oder apoptotisch sein. Die Apoptose spielt bei der Entstehung verschiedener hepatologischer Krankheitsbilder eine wesentliche Rolle. Eine Studie induzierte die Apoptose in einem Mausmodell, was zu einem fulminanten Leberversagen bei den betroffenen Tieren führte [348]. Allerdings sind viele Mechanismen, die zur von Apoptose durch zytotoxische Substanzen führen, größtenteils unbekannt und abhängig von der jeweiligen Substanz und ihren Eigenschaften. Es gibt viele unterschiedliche Methoden um den Zelltod zu bestimmen. Ziel war es, eine möglichst sensitive und spezifische sowie einfach und schnell durchzuführende Nachweismethode für apoptotische Zellen zu ermitteln. Zwei typische Merkmale sind DNA-Fragmentierung in den Zellen und die Expression des CD95-Rezeptors.

CD95 wird in unstimulierten Hepatozyten in der Plasmamembran nur in geringen Mengen exprimiert, wohingegen der größte Teil im Zytosol, besonders im Golgi-Komplex und im Trans-Golgi-Netzwerk exprimiert wird [209, 349, 350]. Für verschiedene z.B. zytotoxische Substanzen wurde gezeigt, dass sie die CD95-Rezeptor-Expression erhöhen und somit die Empfindlichkeit der Zellen in Bezug auf die CD95-vermittelte Apoptose steigern [351, 352]. Die Hochregulierung des CD95-Rezeptor-Ligand-Systems in den Hepatozyten ist aus Versuchen zur Apoptose-induktion mit Chemotherapeutika bekannt [353]. Proapoptotische Stimuli, wie CD95-Ligand [209] und hydrophobe Gallensalze, z.B. Tauroolithocholat, können zu einer Aktivierung der CD95-abhängigen Apoptose führen [349, 354].

Späte Apoptosestadien werden durch biochemische Veränderungen in der Kernstruktur charakterisiert, wie die Aufspaltung der DNA in Oligonukleosomeneinheiten, die durch die TUNEL-Methode durchflusszytometrisch nachgewiesen wurden. Der in der vorliegenden Arbeit angewandte Apo-Direct Apoptosis Detection Kit von BD erwies sich als einfach in der Anwendung. Mit der Methode konnte nachgewiesen werden, dass apoptotische Mechanismen bei antimykotika-inkubierten HepG2/C3A-Zellen eine Rolle spielen. Das Problem der Methode besteht jedoch darin, dass sie nicht spezifisch für apoptotische DNA-Fragmente sind. Das Enzym Terminale Transferase im TUNEL-Assay bindet Nukleotide an alle 3'OH-Enden von DNA-Fragmenten, dementsprechend auch durch Nekrose entstandene. Neben der morphologischen Betrachtung im Elektronenmikroskop, ist die Elektrophorese von DNA und Quantifizierung der

DNA-„Strickleiter“ spezifisch für Apoptose [355]. Jedoch werden nur Fragmente zwischen 180 und 1500 bp quantifiziert und nicht in den Zellen nachgewiesen. Generell liegt die Apoptoserate in gesunden Geweben nur bei 5 %.

In der Literatur wird die Korrelation der quantitativen Expression von Apoptoserezeptoren mit Apoptose-Sensitivität unterschiedlich diskutiert und dargestellt [356]. Eine erhöhte Apoptose-sensitivität korreliert mit einer vermehrten Expression von Todesrezeptoren durch proinflammatorische Zytokinen. Im Gegensatz dazu scheint eine hohe Expression von Apoptose-rezeptoren in Tumorzelllinien keine Voraussetzung für eine intakte Funktion von Apoptose-signalwegen zu sein. Jedoch konnten in manchen Zelllinie gezeigt werden, dass eine Resistenz für rezeptor-abhängige Apoptose trotz hoher Expression von Todesrezeptoren bestehen kann. Im Unterschied dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass es trotz verminderter Expression von Apoptoserezeptoren durch bestimmte Medikamente zur Apoptose kommt [357].

Wir konnten die Apoptose-Parameter etablieren. Anhand der dargestellten Ergebnisse von PCM kann man erkennen, dass PCM in hohen Dosen in Konformität mit der Literatur Schäden sowohl auf Zell- als auch auf DNA-Ebene der HepG2/C3A hervorrufen [358]. Dabei wird die durch PCM induzierte Apoptose als zeitlich vor der Nekrose liegend eingestuft, während die DNA-Fragmentierung erst bei hohen PCM-Konzentrationen, bei denen bereits deutlich Verminderung der Zellviabilität bestimmt wurde, auftraten [359].

Um die Ergebnisse dieser Arbeit einordnen zu können, ist es wichtig, auch die Grenzen ihrer Aussagekraft aufzuzeigen. Eine wichtige Einschränkung der Ergebnisse der Hepatotoxizitätstestung dieser Promotion war es, dass wichtige Aspekte wie die Resorption und Metabolisierung der Medikamente im menschlichen Körper nicht beachtet werden konnten. Mithilfe von Pharmakokinetik-Studien der verschiedenen Antimykotika haben wir die maximale Plasmakonzentrationen (C_{max}), die im menschlichen Körper bei regulärer Gabe erreicht werden, durch Literaturrecherchen ermittelt und die entsprechende Konzentrationen der Arzneimittel zu den Hepatozyten in Zellkultur in Medium und Plasma gegeben. Letztlich wurde dadurch die Pharmakokinetik nur der Muttersubstanz simuliert und Metabolite und ihre Wirkungen nicht untersucht. Zusätzlich wurden die 5-fache und 10-fache Konzentration getestet. Weitere Testungen zu geringeren oder höheren Konzentrationen hätten den Rahmen der Promotion überschritten, wären aber sinnvoll, um das hepatotoxische Potenzial noch mehr zu erfassen. Zudem haben wir uns für Gesundheitskontrollen entschieden, die ohne Medikamente untersucht wurden. So wurde gewährleistet, dass das hepatotoxische Potenzial von den Werten ohne Medikament nur auf die Antimykotika zurückzuführen ist. Patienten, die aufgrund einer invasiven Pilzinfektion Antimykotika einnehmen müssen, haben meist schwere Grunderkrankungen, aufgrund derer die Patienten viele verschiedene Medikamente bekommen. Deshalb kann klinisch der hepatotoxische Effekt der Antimykotika nicht eindeutig nur auf das jeweilige Medikament zurückgeführt werden. Inwieweit die in dieser Arbeit getestete hepato-toxische Wirkung der

Antimykotika-Zubereitungen auf die HepG2/C3A-Zellen klinisch relevant ist, sollte in weiteren Studien mit anderen Zelltypen (z.B. primär isolierten Hepatozyten, HeLa, HuH7-Zellen) sowie anderen Testsystemen (z.B. Mikrochip-Technologie, 3D-Modelle) überprüft werden. Zusätzlich könnten andere Parameter das Spektrum des Hepatotoxizitätsassays erweitern. Neben den bereits getesteten CYP-Isoenzymen CYP1A2 und CYP3A4 sind weitere Isoenzyme wie CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 mit einem erheblichen Anteil an der Biotransformation von wichtigen Arzneistoffen beteiligt. Obwohl CYP2D6 mit etwa 2 % nur einen relativ kleinen Anteil an der Gesamt-CYP450 Menge in der Leber hat, ist es doch für den Arzneistoff-Fremdstoffmetabolisierung von Bedeutung [360]. Einerseits metabolisiert CYP2D6, trotz seiner geringen Mengen im Vergleich zu CYP3A4 in der humanen Leber, etwa 30 % der derzeit auf dem Markt verfügbaren Arzneimittel und andererseits gibt es verschiedene CYP2D6 Polymorphismen [361].

Zur Testung der Antimykotika wurden die handelsüblichen Medikamentenzubereitungen verwendet. Aufgrund dessen konnten wir nur begrenzt den Effekt der Antimykotika auf die Hepatozyten hinsichtlich des hepatotoxischen Potenzials testen. Man sollte jedoch in nachfolgenden Untersuchungen zur eindeutigen Klärung auch die beigemischten Hilfs- und Zusatzstoffe, wie z.B. die Lipidformulierung von Amphotericin B, ohne den Wirkstoff analysieren. Reinstoffprodukte erzielen bei Untersuchungen die überzeugendsten Ergebnisse, da das Resultat nicht durch Zusatzstoffe beeinträchtigt werden kann. Allerdings sind die Reinsubstanzen, wie z.B. die Lipidformulierungen entweder nicht erhältlich oder ihre genaue patentgemäße Zusammensetzung nicht bekannt und können somit nicht imitiert werden. Obwohl man nur solche Stoffe als Hilfsstoffe verwendet, deren Sicherheit und gute Verträglichkeit bekannt oder sorgfältig geprüft ist, können scheinbar "inerte" Hilfsstoffe durchaus eine eigene Wirkung entfalten [362]. Die Hilfsstoffe der Antimykotika sind insgesamt als nicht toxisch bekannt. Jedoch gibt es Zusatzstoffe, die die Anwendung der Antimykotika-Zubereitungen einschränken können. Wie bereits weiter oben diskutiert, enthält die fertige Anidulafungin-Infusion 24 Vol % Ethanol zur Lösungsvermittlung des Wirkstoffes, sowie Voriconazol Cyclodextrin (SBECD).

Trotz der Nachteile von primären humanen Hepatozyten besteht weiterhin ein starkes Interesse an der Verwendung für toxikologische Fragestellungen. Der Einsatz von Zellkulturen humanen primärer Hepatozyten erlaubt die Untersuchung von Substanzen mit einem Stoffwechselprofil, das mehr der Situation in vivo entspricht [363, 364]. Im Rahmen der Dienstleistungsanalyse der Firma Primacyt wurde eine geringe Anzahl an Validierungsversuchen durchgeführt, aufgrund dessen konnte nur ein orientierender Überblick über die verschiedenen Antimykotika bzw. Signale für die möglichen hepatotoxischen Effekte geben werden. Eine höhere Anzahl an Tests wäre notwendig, bei allerdings nur sehr begrenzt zur Verfügung stehendem humanen Lebermaterial. Der entscheidende Nachteil von primären Hepatozyten ist die zunehmende Dedifferenzierung mit anhaltender Kultivierungsdauer und der Verlust der organspezifischen

Eigenschaften. Dieses äußert sich morphologisch in einem „Abflachen“ der sonst kubischen Zellen und dem Ausbilden von Zell-Zell-Kontakt. Die eingeschränkte Lebensfähigkeit und -dauer korreliert mit dem Verlust der metabolischen Aktivität. Unter klassischen Kulturbedingungen sinkt die Enzymaktivität der frisch isolierten Hepatozyten im Monolayer innerhalb der ersten drei Tage auf 25-60 % der Ausgangswerte und führt zu einem veränderten Reaktionsprofil der Hepatozyten [365, 366]. Bedingt der limitierten Verfügbarkeit der humanen Hepatozyten durch den Mangel an geeigneten Spenderorganen werden für Routineuntersuchungen häufig Nagetierzellen verwendet. Im Gegensatz zum menschlichen Gewebe kann Tiergewebe weitgehend standardisiert werden. Allerdings ist beim Arbeiten mit tierischen Hepatozytenkulturen die Wahl der verwendeten Tierspezies von großer Bedeutung. Es liegen viele Daten über den Fremdstoffmetabolismus von Rattenhepatozyten vor. Trotz ihrer kontinuierlichen Verfügbarkeit und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse besteht dabei das Risiko falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse. Denn Hepatozyten anderer Spezies eignen sich nicht immer zur Analyse des Metabolitenspektrums, da sich die Expressionen fremdstoffmetabolisierender Enzyme zwischen den Spezies unterscheiden können [367]. Gutes Beispiel ist der häufig eingesetzte Protonenpumpeninhibitor Pantoprazol beim Menschen nicht hepatotoxisch, da der toxische Metabolit nicht durch humane Hepatozyten gebildet wird, während die gleiche Dosis für Hunde letale Auswirkungen hervorruft [91]. Humane Primärhepatozyten sind sowohl frisch isoliert als auch kryokonserviert kommerziell erhältlich, allerdings übersteigt wie bei kompletten Spenderorganen die Nachfrage das Angebot. Aufgrund der Kosten und der aufwendigen Verwendungen (Isolierung und Kultivierung) der primären Hepatozyten werden zunehmend permanente humane Leberzelllinien verwendet. Zusätzlich ist man von Versuchstieren wegen des Wegfallens der Präparation unabhängig. Generell hat die Nutzung von Zelllinien den Vorteil, dass Versuchsergebnisse verschiedenster Institutionen und Forschungsgruppen aufgrund hoher Standardisierungsrate und gleichbleibender Qualität besser miteinander verglichen werden können. Zelllinien haben eine lange Lebensdauer und können somit für viele Tests verwendet werden. Die individuellen Zelllinien stammen jeweils nur von einem Spender ab und können bei Zellbanken erworben werden. Zelllinien haben aber auch Nachteile. Bei der Immortalisierung der Zellen ist zu bedenken, dass Entdifferenzierungsprozesse stattfinden können. Dies kann mit dem Verlust zellspezifischer Funktionen korrelieren.

Aufgrund genereller Unterschiede zwischen der permanenten Zelllinie und den primären Hepatozyten lassen sich Ergebnisse nicht direkt vergleichen, da die durchgeführten Untersuchungen unterschiedliche Expressionsebenen betrachten. Vergleicht man beide Zellarten unter Hinzuziehung von Ergebnissen auch aus der Literatur stellen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede heraus [291].

Wir haben uns für die HepG2/C3A als Testzellen entschieden, aufgrund der häufigen Anwendung für toxikologische Fragestellungen bedingt durch die gezielte Induktion der Isoenzyme des Cytochroms sowie der Vorteile permanenter Zelllinien [368].

In Langzeitstudien zeigt sich eine steigende Inzidenz systemischer Pilzinfektion [98, 369]. Als wesentliche Gründe werden die Zunahme an immunsupprimierten Patienten (z.B. Organ- und Knochenmarktransplantationen), aber auch die Veränderung bzw. Intensivierung medizinischer Maßnahmen, wie z.B. vermehrter Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, intensivere Chemotherapie bei Tumorerkrankungen, sowie aufwändigere und „aggressive“ intensiv-medizinische Behandlung, verantwortlich gemacht [370]. Der individuelle Einsatz der Antimykotika ist schwierig, da ITS-Patienten einer starken interindividuelle schwankenden Pharmakokinetik unterliegen. Durch die Insuffizienzen, sowie durch Medikamenteninteraktionen kommt es zur Veränderung des Verteilungsvolumens. Durch ein therapeutische Drug Monitoring (TDM) können Arzneimittelkonzentrationen zu frühzeitigen Erfassung von Therapieversagen durch Unter- oder Überdosierung realisiert werden. Das TDM bezeichnet die Messung von Serum- und Plasmakonzentrationen eines zugeführten Arzneimittels oder von dessen Metaboliten. Dadurch kann die Pharmakokinetik von Medikamenten verbessert werden. Es ermöglicht, dass zu hohe Plasmaspiegel vermieden werden, so dass z.B. die Leberfunktion von ITS-Patienten nicht zusätzlich beeinträchtigt wird. Allerdings sind zum Verständnis der Pharmakokinetik von ITS-Patienten, sowie zur Optimierung der medikamentösen Therapie weitere Studien erforderlich. Zusätzlich sind die verschiedenen Antimykotikagruppen unterschiedlich zu bewerten. Für AmB und seine Lipidformulierungen ist der Nutzen eines TDM weiterhin unklar, da nicht geklärt ist, ob wesentlich erhöhte Serumspiegel zu verstärkter Toxizität führen können [371]. Echinocandinen besitzen eher eine lineare Pharmakokinetik mit geringem hepatischen Metabolismus und entsprechend wenigen DILI (Drug-induced liver injury = DILI). Allerdings fehlen bei speziellen Patientengruppen wie bei Leberversagen, Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) oder Plasmapherese in der Literatur valide Daten [372]. Bei den Azolen spielt der TDM die größte Rolle. Die Azole unterliegen einem ausgedehntem hepatischen Mechanismus, die folglich viele DILI aufweisen. Bei den Substanzen ist eine klare Korrelation zwischen Exposition und Wirkung sowie Nebenwirkungen (Hepatotoxizität) bekannt. Zwischen dem einzelnen Azolen bestehen große pharmakokinetische Unterschiede.

Die Sicherheit in Bezug auf potentielle Arzneimittelinteraktionen und Nebenwirkungen (z.B. Hepatotoxizität) sowie die Wirksamkeit einer Substanz stellen heutzutage mit je etwa 30 % die Hauptursache für das Scheitern klinischer Studien oder die Rücknahme eines Arzneistoffes vom Markt dar [373, 374]. DILI ist eine der häufigsten Gründe für die Rücknahme eines bereits zugelassenen Medikaments, wie z.B. Ximelagatran, Troglitazon und Sitaxentan, durch die FDA. Ximelagatran, ein direkter Thrombininhibitor, war nur 20 Monate lang im Handel und wurde 2006

wegen DILI vom Hersteller Astra Zeneca wieder vom Markt genommen [375, 376]. Weil DILI mit einer Häufigkeit von 1:10000 bis 1:100000 relativ selten auftreten, bleiben sie in den Zulassungsstudien meist unentdeckt. Die Korrelation zwischen Befunden in toxikologischen Prüfungen und dem Auftreten in klinischen Studien ist verhältnismäßig gering [377, 378]. Die therapeutischen Möglichkeiten beim Auftreten eines akut auf chronischen Leberversagen sind beschränkt. Generell gibt es nur zwei Möglichkeiten: einerseits die hämodynamische Stabilisierung (Volumensubstitution mit kristallinen oder kolloidalen Lösungen) und Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes sowie andererseits das Absetzen potenziell hepato-toxischen Medikamenten. Aufgrund dessen ist es notwendig im klinischen Alltag die Evaluierung der Kausalität zwischen Medikamenteneinnahme und toxischer Leberschädigung besser einschätzen zu können, um Nutzen und Risiko der Dosierung abzuwägen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Hepatotoxische Arzneimittelnebenwirkungen können zum DILI („Drug-induced-liver-injury“, DILI) bis hin zum akuten Leberversagen (ALV) führen. Das häufigste und bekannteste Medikament für eine vorhersehbare DILI ist Paracetamol. Allerdings ist der genaue Mechanismus der DILI oft unbekannt und wahrscheinlich auch für viele Wirkstoffe unterschiedlich und multifaktoriell. In der Arzneistoffentwicklung stellt die Hepatotoxizität die Forscher vor einer großen Herausforderung, da diese oft idiosynkratisch (unvorhersehbar, selten) bzw. erst nach längerer Medikamenteneinnahme auftreten. Darüber hinaus stellt die Hepatotoxizität auch den häufigsten Grund für die Rücknahme eines bereits zugelassenen Medikaments dar. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass toxikologische Daten aus Tierversuchen (in vivo) nur schlecht auf den Menschen zu übertragen sind. Hinzukommt, dass es gegenwärtig keine standardisierten und validierten in vitro Modelle, mit denen Hepatotoxizität von neuen Arzneistoffen zuverlässig abgeschätzt werden kann, vorhanden sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es unter Verwendung eines zellulären Modellsystems auf Basis der humanen Hepatomzelllinie HepG2/C3A, der zur Früherkennung eines Leberversagens entwickelt wurde, das hepatotoxische Potenzial intensiv medizinisch relevanter Arzneimittel am Beispiel der Antimykotika zu testen.

Dazu konnten auf Grundlage einer genetisch charakterisierten und auf Funktionalität geprüften Master- und Workingzellbank der HepG2/C3A zur Standardisierung der Parameter zuverlässige Aussagen bezüglich exogener Toxizität gemacht werden. Dabei zeigten die Versuchszellen Einschränkungen bei der Vitalität (Zellzahl, Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase), der Funktionalität (Mikroalbum-Bestimmung, Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen) und metabolische Veränderungen (CYP1A2-Aktivität). Die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen dienten dazu, das Hepatotoxizitätspotenzial beurteilen.

Paracetamol konnte als Positivkontrolle für die in vitro-Testung der Hepatotoxizität etabliert werden. Bei einer Konzentration von 15,24 mM zeigten sich deutliche Beeinträchtigungen der Zellfunktionalität und – vitalität, sowie metabolisch im Zellkulturmedium und Plasma.

Die Validierung des hepatotoxischen Potenzials mit primär isolierten Hepatozyten der Antimykotika Anidulafungin, Caspofungin, Fluconazol und von Paracetamol zeigte trotz der unterschiedlichen Vor- und Nachteile der zellbasierten in vitro-Tests übereinstimmende Tendenzen hinsichtlich der mitochondrialen Aktivität und CYP1A2.

Durch die erfolgreiche Erweiterung des Tests um die Parameter DNA-Fragmentierung, Todesrezeptor CD95 und CYP3A4 konnte die Bestimmung des Potenzials hinsichtlich der Apoptose und metabolischer Aktivität ausführlicher charakterisiert werden.

Mit den vorliegenden Ergebnissen der Antimykotika-Testung konnte gezeigt werden, dass der Mikrotiterplatten-Assay auf Basis der HepG2/C3A-Zelllinie ein klinisch relevantes in vitro-System zur Testung der Hepatotoxizität darstellt.

Liposomales Amphotericin B (L-AmB) zeigte in den Analysen ein geringfügiges hepatotoxisches Potenzial. Wir konnten zeigen, dass durch die Lipidformulierung die bekannte und ausgeprägte Toxizität von Amphotericin B verringert werden konnte. In Konformität mit der Literatur zeigten das Triazol der 1. Generation Fluconazol und Voriconazol der 2. Generation deutliche hepatotoxische Beeinträchtigungen der HepG2/C3A.

Auf Grund der günstigen Pharmakokinetik der Echinocandine ist mit einem geringen Interaktionspotenzial zu rechnen. Caspofungin ist geringfügig hepatotoxisch. Es wurden geringfügige Beeinträchtigungen hinsichtlich sämtlicher Parameter in allen Konzentrationen bestimmt. Auch Anidulafungin zeigte sich wenig hepatotoxisch, jedoch wurden mit Konzentrationssteigerungen deutliche antiproliferierende Effekte (z.B. erhöhte LDH-Freisetzung) und eine eingeschränkte Mikroalbuminsynthese der HepG2/C3A-Zellen beobachtet. Aufgrund der hohen Proteinbindung wurden geringe Auswirkungen in den Plasmaversuchen bestimmt. Anidulafungin wird nicht hepatisch metabolisiert und bislang gibt es keine Berichte über Arzneimittelinteraktionen. Ob die ethanolhaltige Formulierung sowohl klinisch als auch im Testsystem einen negativen Einfluss bewirkt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Im Rahmen der limitierten Untersuchungen konnten lediglich die C_{max} , 5-fach C_{max} und 10-fach C_{max} -Konzentration der Antimykotika im Zellkulturmedium und im Plasma an der permanenten Zelllinie untersucht werden. Zur Testung wurden die handelsüblichen Antimykotikazubereitungen verwendet, so dass die beigemischten Hilfs- und Zusatzstoffe nicht berücksichtigt werden konnten. Obwohl ein breites Spektrum an Parametern zur Beurteilung des hepatotoxischen Potenzials verwendet wurde, können weitere Parameter (z.B. CYP2C19, CYP2D6, Proteinbestimmung), andere Zellen (HeLa, HuH7) oder andere Testsysteme (z.B. Mikrochip-Technologie, 3D-Modelle) die Aussagekraft verstärken.

Trotz neuer antimykotischer Wirkstoffe, einer verbesserten Diagnostik und frühzeitiger Therapie hat die Inzidenz der systemischen Mykosen mit einer hohen Mortalität in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Für den gezielten Einsatz der Antimykotika sind die therapeutische Breite, intra- und interindividuelle Variabilität der Plasmakonzentrationen und deren eventuellen toxischen Auswirkungen von besonderer Bedeutung. In diesem Zusammenhang wäre die therapeutische Spiegelbestimmung (Therapeutisches Drug Monitoring) der Antimykotika eine wichtige Maßnahme für die möglichst risikomarme Behandlung kritisch kranker Patienten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Jörk A (2010) *Erkrankung der Leber - akutes Leberversagen*. <http://www.alexander-joerk.de/media/fb7cc08a36cc622effff8145fffff0.pdf> (26.11.2014)
2. Lee WM (1993) *Acute liver failure*. N Engl J Med. 329(25):1862–1872
3. Baenkler H (2010) *Kurzlehrbuch Innere Medizin*. 163 Tabellen, 2., aktualisierte Aufl. Thieme, Stuttgart
4. Bauer M, Kortgen A (2012) *Leberdysfunktion beim Intensivpatienten*. Anästh Intensivmedizin (53):470–487
5. Rifai K, Bahr M (2003) *Akutes Leberversagen*. Internist (44):585–598
6. Böker K (2001) *Akutes Leberversagen*. Internist 42 (4):545–563
7. Jalan R, Williams R (2002) *Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options*. Blood Purif. 20(3):252–261
8. Kimura S, Yoshioka T, Shibuya M, Sakano T, Tanaka R, Matsuyama S (2001) *Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival*. Crit Care Med. 29(6):1159–1163
9. Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A (2002) *Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients*. Chest 122(5):1715–1720
10. Harbrecht BG, Zenati MS, Doyle HR, Mc Michael J, Townsend RN, Clancy KD, Peitzman AB (2002) *Hepatic dysfunction increases length of stay and risk of death after injury*. The J Trauma. 53(3):517–523
11. Brienza N, Dalfino L, Cinnella G, Diele C, Bruno F, Fiore T (2006) *Jaundice in critical illness: promoting factors of a concealed reality*. Intensive Care Med. 32(2):267–274
12. Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T (2004) *Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes*. Int J Oncol. 24(3):687–696
13. Hughes RD, Wendon J, Gimson AE (1991) *Acute liver failure*. Gut Suppl:S86-91
14. Staubner R, Stadtbauer G, Struber G, Kaufmann P (2006) *Evaluation of four prognostic scores in patients with acute-on liver failure*. J Hepatol (44):69–70
15. Szabo G, Romics L, Frendl G (2002) *Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome*. Clin Liver Dis. 6(4):1045-66, x
16. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A (2001) *Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes*. Crit Care Med. 29(7 Suppl): S42-7
17. Tu W, Satoi S, Zhang Z, Kitade H, Okumura T, Kwon A, Kamiyama Y (2003) *Hepato-cellular dysfunction induced by nitric oxide production in hepatocytes isolated from rats with sepsis*. Shock. (Augusta, Ga.) 19(4):373–377
18. Bauer M, Paxian M, Kortgen A (2004) *Akutes Leberversagen. Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie*. Der Anaesthesist 53(6):511–530
19. Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz, Philipp G H (2007) *Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study*. Crit Care Med. 35(4):1099–1104
20. Nickolaus B (2003) *Extrakorporale Detoxikation. Künstliche Leber vorgestellt*. Dtsch Ärzteblatt Int (100 (1-2)):17
21. Lee WM (2003) *Drug-induced hepatotoxicity*. N Engl J Med. 349(5):474–485

22. Sen S, Mohenso L, Sjodin L, Cheshire L, Williams R, Bjornsson E, Jalan R (2004) *Baseline SOFA score and its lack early improvement accurately predicts mortality in patients with acute-on-chronic liver failure*. Hepatology 2004((1):489 A):40
23. Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G (2011) *Acute liver failure - a life threatening disease*. Dtsch Ärzteblatt (108 (42)):714–720
24. Lee WM, Squires RH, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH (2008) *Acute liver failure: Summary of a workshop*. Hepatology 47(4):1401–1415
25. Polson J, Lee WM (2005) *AASLD position paper: the management of acute liver failure*. Hepatology 41(5):1179–1197
26. O'Grady JG, Williams R (1993) *Classification of acute liver failure*. Lancet 342(8873):743
27. Herold G (2013) *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*, 2013rd edn. Herold, Köln
28. Leifeld L, Merk P, Schmitz V, Nattermann J, Kalff JC, Hirner A, Sauerbruch T, Spengler U (2008) *Course and therapy of acute liver failure*. Eur J Med Res.13(2):87–91
29. (2011, c1955) *Die Intensivmedizin*, 11., überarb. und erw. Aufl. Springer Medizin, Berlin
30. Universitäts Klinikum Heidelberg *Das akute Leberversagen*. <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Das-akute-Leberversagen.114041.0.html>. (16.12.2014)
31. Hinderling PH (1989) *Arzneimittelentwicklung und Risikopopulationen*. Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis = Revue suisse de médecine Praxis 78(12):321–325
32. Thürmann PA (2003) *Detection of drug-related adverse events in hospitals*. Expert Opin Drug Saf. 2(5):447–449
33. Ostapowicz G, Lee WM (2000) *Acute hepatic failure: a Western perspective*. J Gastro-enterol Hepatol. 15(5):480–488
34. Nathwani RA, Kaplowitz N (2006) *Drug hepatotoxicity*. Clin Liver Dis.10(2):207-17, vii
35. Pessayre D, Larrey D, Biour M (1999) *Drug-induced liver injury*. In: Bircher, J.; Benhaman, J. P.; Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford Medical Publications 1999:1261–1315
36. Kuntz E (1998) *Praktische Hepatologie*. Historie - Morphologie - Biochemie - Diagnostik - Klinik - Therapie. Barth, Heidelberg
37. Schmidt E, Schmidt F (2000) *Leberschäden durch Medikamente*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 148–213
38. Teschke R, Hennermann KH, Schwarzenbock A (2006) *Arzneimittelbedingte Hepato-toxizität*. Diagnostische Hilfe durch Bewertungsskala. Dtsch Ärzteblatt Int (103):2311–2318
39. Holt MP, Ju C (2006) *Mechanisms of drug-induced liver injury*. The AAPS J 8(1):E48-54
40. Teschke R (2001) *Toxische Lebererkrankungen*. Alkohol, Arzneimittel, Gewerbe- und Naturtoxine; Thieme, Stuttgart
41. Russmann S, Lauterburg B (2002) *Medikamentöstoxische Leberschäden*. Schweiz Med Forum (44):1044–1050
42. Krähenbühl S (2004) *Toxische Leberschäden*. Ther Umsch. 61(8):529–534
43. Teschke R (2002) *Arzneimittelbedingte Lebererkrankungen*. Z Gastroenterol. 40(5):305–326
44. Lee WM (2008) *Acetaminophen-related acute liver failure in the United States*. Hepatol Res. 38 Suppl 1:S3-8
45. Norris W, Paredes AH, Lewis JH (2008) *Drug-induced liver injury in 2007*. Curr Opin Gastroenterol 24(3):287–297

46. Rutherford A, Davern T, Hay JE, Murray NG, Hassanein T, Lee WM, Chung RT (2006) *Influence of high body mass index on outcome in acute liver failure*. Clin Gastroenterol Hepatol. 4(12):1544–1549
47. Lee WM (2007) *Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue*. Hepatology 46(4):966–970
48. Vermeulen NP, Bessems JG, Van de Straat, R (1992) *Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention*. Drug Meatab Rev. 24(3):367–407
49. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD (1984) *N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxiadtaiion product of acetaminophen*. Proc Natl Acad Sci USA (81 (5)):1327–1331
50. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldéus P, Orrenius S (1985) *The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺*. J Biol Chem. 260(24):13035–13040
51. Miners JO, Drew R, Birkett DJ (1984) *Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice in vivo*. Biochem Pharmacol. 33(19):2995–3000
52. Heard KJ (2008) *Acetylcysteine for acetaminophen poisoning*. N Engl J Med. 359(3):285–292
53. Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB (1973) *Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo*. J Pharmacol Exp Ther. 187(1):195–202
54. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB (1973) *Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism*. J Pharmacol Exp Ther. 187(1):185–194
55. Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM, Hinson JA (1996) *Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress*. Chemical research in toxicology 9(3):580–585
56. Brent JA, Rumack BH (1993) *Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury?* J Toxicol Clin Toxicol. 31(1):173–196
57. Adamson GM, Harman AW (1993) *Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen*. Biochem Pharmacol 45(11):2289–2294
58. Blazka ME, Germolec DR, Simeonova P, Bruccoleri A, Pennypacker KR, Luster MI (1995) *Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-kB and NF-IL6 DNA binding activity*. J Inflamm. 47(3):138–150
59. Laskin DL, Pilaro AM, Ji S (1986) *Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. II. Mechanism of macrophage accumulation and activation*. Toxicol Appl Pharmacol. 86(2):216–226
60. Ray SD, Jena N (2000) *A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), and BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo*. Arch Toxicol. 73(10-11):594–606
61. Zimmerman HJ (2000) *Drug-induced liver disease*. Clin Liver Dis. 4(1):73-96, vi
62. Schlatter C (2009) *Entgiftung zum Gift. Nebenwirkung Leberschaden*. Pharmazeutische Zeitung (35)

63. Robin MA, Le Roy M, Descatoire V, Pessayre D (1997) *Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis*. J Hepatol. 26 Suppl 1:23–30
64. Reed JC (2001) *Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery*. Trends Mol Med. 7(7):314–319
65. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A (2001) *Mitochondria in steatohepatitis*. Semin Liver Dis. 21(1):57–69
66. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL (1998) *Molecular pathogenesis of cholestasis*. N Engl J Med. 339(17):1217–1227
67. Beigel J (2005) *Gen- und Proteinexpressionsanalysen an primären Rattenhepatozyten*, Ruprecht-Karls-Universität
68. Efferth T (2006) *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*. Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
69. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP (1999) *Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1*. Biochim Biophys Acta. 1461(2):359–376
70. Kensler TW, Qian G, Chen J, Groopman JD (2003) *Translational strategies for cancer prevention in liver*. Nat Rev Cancer. 3(5):321–329
71. Forth W, Forth/Henschler/Rummel/Förstermann/Starke (2001) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 8., völlig überarb. Aufl. Urban & Fischer, München
72. Martignoni M, Groothuis, Geny M M, Kanter R de (2006) *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2(6):875–894
73. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics 6(1):1–42
74. Böhme (2010) *Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung und Identifizierung genotoxischer Verbindungen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität
75. Keller E (2006) *Unerwünschte Arzneimittelwirkungen: Ansätze zur Inzidenzschätzung und Signalgenerierung mit fallbasierten Pharmakovigilanzdaten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität
76. Bundesrepublik Deutschland (2012) *Arzneimittelgesetz*
77. Guengerich FP (2011) *Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development*. Drug Metab Pharmacokinet. 26(1):3–14
78. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. (2013) *Report Pharma Daten 2013 - Forschung und Entwicklung*
79. (2009) ISO *"Biological evaluation of medical devices" Part 5 - Test for in vitro cytotoxicity*. ISO 10993-5. In: ISO Schweiz 2009
80. Freissmuth M, Böhm S, Offermanns S (2012) *Pharmakologie und Toxikologie*. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer-Lehrbuch. Springer, Dordrecht
81. Schöffski O (2008) *Pharmabetriebslehre*, 2., vollst. überarb. u. erweiterte Aufl. SpringerLink : Bücher. Springer, Berlin

-
82. Schwarz JA (2005) *Leitfaden Klinische Prüfungen von Arzneimitteln und Medizinprodukten. Good clinical practice, Planung, Organisation, Durchführung und Dokumentation*, 3., aktualisierte und erw. Aufl. Der pharmazeutische Betrieb, Bd. 43. ECV - Ed.-Cantor-Verl., Aulendorf
 83. Stapff M (2008) *Arzneimittelstudien. Eine Einführung in klinische Prüfungen für Ärzte, Studenten, medizinisches Assistenzpersonal und interessierte Laien*, 5., überarb. Aufl. Zuckschwerdt, Germering
 84. Pavkovic M (2014) *Evaluierung neuer Sicherheits-Biomarker in präklinischen Studien*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität
 85. Coecke S, Rogiers V, Bayliss M, Castell J, Doehmer J, Fabre G, Fry J, Kern A, Westmoreland C (1999) *The Use of Long-term Hepatocyte Cultures for Detecting Induction of Drug Metabolising Enzymes*: Altern Lab Anim. 27(4):579–638
 86. Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ, Wrighton SA (2000) *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*. J Pharmacol Toxicol Methods. 44(1):313–324
 87. Guillouzo A (1998) *Liver cell models in in vitro toxicology*. Environ Health Perspect. 106 Suppl 2:511–532
 88. Ulrich RG, Bacon JA, Cramer CT, Peng GW, Petrella DK, Stryd RP, Sun EL (1995) *Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development*. Toxicol Lett. 82-83:107–115
 89. Ohno Y, Miyajima A, Sunouchi M (1998) *Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells*. Toxicol Lett. 102-103:569–573
 90. Ullrich A, Berg C, Hengstler JG, Runge D (2007) *Use of a standardised and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion*. ALTEX 24(1):35–40
 91. Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koose T, Burger H, Maas J, Oesch F (2003) *New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures*. Drug Metab Rev. 35(2-3):145–213
 92. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW (1997) *Isolated hepatocytes--past, present and future*. Cell Biol Toxicol. 13(4-5):223–233
 93. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2004) *Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man*. Current Drug Metab. 5(5):443–462
 94. Kleessen B, Noack J, Blaut M (1999) *Distribution of viable and non-viable bacteria in the gastrointestinal tract of gnotobiotic and conventional rats*. Microb Ecol Health D (11(4)): 218–225
 95. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M (1999) *Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells*. FASEB J 13(14):1883–1900
 96. (2012) Bionas. www.bionas-discovery.com. (13.03.2015)
 97. Griffith LG, Swartz MA (2006) *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nature reviews. Molecular cell biology 7(3):211–224

98. Pfaller MA, Diekema DJ (2007) *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. Clin Microbiol Rev. 20(1):133–163
99. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E (2004) *Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens*. Clin Microbiol Infect. 10 Suppl 1:48–66
100. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG (2001) *Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients*. Clin Infect Dis. 32(9):1319–1324
101. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR *Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends*. Clin Infect Dis. 2006(43):3–14
102. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP (2001) *Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study*. Clin Infect Dis. 33(2): 177–186
103. *Neue Entwicklung in der Therapie systemischer Pilzinfektionen*. Supportivtherapie. Fokus Onkologie 2002(7)
104. Heinz WJ (2007) *Pilzinfektionen. Prophylaxe bei hämatologischen Patienten*. Journal Onkologie(5)
105. Schedel I (2005) *Neue Medikamente zur Behandlung systemischer Mykosen*. Der Internist (46 (6)):659–670
106. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH (2010) *An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond*. Nat Rev Drug Discov. (9): 719–727
107. Metzke B, Neubauer WC, Hieke S, Jung M, Wäsch R, Engelhardt M (2012) *Use of systemic antifungals in daily clinical practice in the haematology and oncology setting: results of a prospective observational analysis*. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 21(9):953–963
108. Groß BN (2013) *Real-life-Analysen zur Arzneimitteltherapie in der Hämatologie: Der Einsatz systemischer Antimykotika und die Prävalenz potentieller Arzneimittelaktionen*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität
109. Cifani C, Costantino S, Massi M, Berrino L (2012) *Commercially available lipid formulations of amphotericin b: are they bioequivalent and therapeutically equivalent?* Acta Biomed. 83(2):154–163
110. Böhme A, Buchheidt D, Einsele H *Leitlinie Antimykotika der AGIHO*. www.dgho-infektionen.de
111. Boswell GW, Buell D, Bekersky I (1998) *AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review*. J Clin Pharmacol 38(7):583–592
112. Arikan S, Rex JH (2001) *Lipid-based antifungal agents: current status*. Curr Pharm Des. 7(5):393–415
113. Balazsovits JA, Mayer LD, Bally MB, Cullis PR, McDonell M, Ginsberg RS, Falk RE (1989) *Analysis of the effect of liposome encapsulation on the vesicant properties, acute and cardiac toxicities, and antitumor efficacy of doxorubicin*. Cancer Chemother Pharmacol. 23(2):81–86
114. Gilead (2003) *Fachinformation Gilead Sciences GmbH*, Martiensriede, München
115. Zeitschrift für Chemotherapie (1993) *Neueinführung: Liposomales Amphotericin B* (Heft 4):27–28. www.zct-berlin.de/neueinfuehrung
116. Wiebe VJ, DeGregorio MW (1988) *Liposome-encapsulated amphotericin B: a promising new treatment for disseminated fungal infections*. Rev Infect Dis. 10(6):1097–1101

117. Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, Aoun M, Kvaloy S, Catovsky D, Pinkerton CR, Schey SA, Jacobs F, Oakhill A, Stevens RF, Darbyshire PJ, Gibson BE (1997) *A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients*. Br J Haematol. 98(3):711–718
118. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, Dasbach EJ, Platt R (2001) *Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy*. Clin Infect Dis. 32(5):686–693
119. Cheng JT, Witty RT, Robinson RR, Yarger WE (1982) *Amphotericin B nephrotoxicity: increased renal resistance and tubule permeability*. Kidney Int. 22(6):626–633
120. Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, Bowden R, Anaissie E, Hiemenz J, Lister J (1999) *Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis*. Clin Infect Dis. 29(6):1402–1407
121. European Medicines Agency (2009) *Anhang 1 - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels*. Cancidas. www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Informationen/human/000379/WC500021033.pdf
122. Rogers TR, Frost S (2009) *Newer antifungal agents for invasive fungal infections in patients with haematological malignancy*. Br J Haematol. 144(5):629–641
123. Hajdu R, Thompson R, Sundelof JG, Pelak BA, Bouffard FA, Dropinski JF, Kropp H (1997) *Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872)*. Antimicrob Agents Chemother 41(11):2339–2344
124. Antiinfektiva *Caspofungin*. www.infektionsschutz.at/Antimykotika_Caspofungin.de
125. Cornley Ac *Caspofungin*. www.p-e-g.org/archiv_tmp/jahrestagung_18/ss/abs-cornely.de
126. Bendig C (2010) *Wirksamkeit und Toxizität von antifungaler Prophylaxe bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation*. Dissertation, Universität Hamburg
127. Keating G, Figgitt D (2003) *Caspofungin: a review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis*. Drugs 63(20):2235–2263
128. Aronson JK (2007) *Side effects of drugs annual 29. A worldwide yearly survey of new data and trends in adverse drug reactions*. Elsevier, Amsterdam, Oxford
129. Vazquez JA, Sobel JD (2006) *Anidulafungin: a novel echinocandin*. Clin Infect Dis. 3(2):215–222
130. Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ (2007) *Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis*. N Engl J Med. 356(24):2472–2482
131. Dowell JA, Knebel W, Ludden T, Stogniew M, Krause D, Henkel T (2004) *Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal*. J Clin Pharmacol. 44(6):590–598
132. FDA (2006) *US-Packungsbeilage - Anidulafungin*. Eraxis
133. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (2014) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Saunders
134. Livertox (2014) *Clinical and Research Information on drug-induced liver injury - Echinocandine*. www.livertox.nih.gov/Echinocandine.htm
135. Perea S, Patterson TF (2002) *Antifungal resistance in pathogenic fungi*. Clin Infect Dis. 35(9):1073–1080

-
136. White TC, Agabian N (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol. 177(18):5215–5221
137. (2012) Fachinformation Diflucan i.v. 2 mg/ml
138. Hof H (2003) *Mykologie für Mediziner*. Grundlagen, Pathogenese, Manifestationen, Diagnostik, Therapie ; 64 Tabellen. Thieme, Stuttgart [u.a.]
139. Jacobson MA, Hanks DK, Ferrell LD (1994) *Fatal acute hepatic necrosis due to fluconazole*. Am J Med. 96(2):188–190
140. Livertox Clinical and Research Information on drug-induced liver injury - Fluconazole. www.livertox.nih.gov/Fluconazole.htm. (25.03.2014)
141. Egunsola O, Adefurin A, Fakis A, Jacqz-Aigrain E, Choonara I, Sammons H (2013) *Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review*. Eur J Clin Pharmacol 69(6):1211–1221
142. Schwartz S, Thiel E (2004) *Update on the treatment of cerebral aspergillosis*. Ann Hematol. 83 Suppl 1:S42–4
143. Elter T, Sieniawski M, Gossmann A, Wickenhauser C, Schröder U, Seifert H, Kuchta J, Burhenne J, Riedel K, Fätkenheuer G, Cornely OA (2006) *Voriconazole brain tissue levels in rhinocerebral aspergillosis in a successfully treated young woman*. Int J Antimicrob Agents 28(3):262–265
144. Böhme A, Ruhnke M, Buchheidt D, Cornely OA, Einsele H, Enzensberger R, Hebart H, Heinz W, Junghanss C, Karthaus M, Krüger W, Krug U, Kubin T, Penack O, Reichert D, Reuter S, Silling G, Südhoff T, Ullmann AJ, Maschmeyer G (2009) *Treatment of invasive fungal infections in cancer patients--recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)*. Ann Hematol. 88(2):97–110
145. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O (2008) *Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes*. Clin Infect Dis. 46(2):201–211
146. Amigues I, Cohen N, Chung D, Seo SK, Plescia C, Jakubowski A, Barker J, Papanicolaou GA (2010) *Hepatic safety of voriconazole after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant. 16(1):46–52
147. Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H (2002) *Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis. 34(5):563–571
148. Gupta AK, Tomas E (2003) *New antifungal agents*. Dermatol Clin. 21(3):565–576
149. Livertox (2014) Clinicial and Research Information on drug-induced liver injury - Voriconazole. www.livertox.nih.gov/Fluconazole.htm
150. Dowell JA, Stogniew M, Krause D, Henkel T, Weston IE (2005) *Assessment of the safety and pharmacokinetics of anidulafungin when administered with cyclosporine*. J Clin Pharmacol. 45(2):227–233
151. Liu P, Ruhnke M, Meersseman W, Paiva JA, Kantecki M, Damle B (2013) *Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother. 57(4):1672–1676
152. Sundar S, Chakravarty J (2010) *Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response*. J Glob Infect Dis. 2(2):159–166

-
153. Dupont B (2002) *Overview of the lipid formulations of amphotericin B*. J Antimicrob Chemother. 49 Suppl 1:31–36
154. Krishna G, Vickery D, Ma L, Yu X, Noren C, Power E, Beresford E, Medlock M (2011) *Lack of pharmacokinetic drug interaction between oral posaconazole and caspofungin or micafungin*. J Clin Pharmacol 51(1):84–92
155. Stone JA, Migoya EM, Hickey L, Winchell GA, Deutsch PJ, Ghosh K, Freeman A, Bi S, Desai R, Dilzer SC, Lasseter KC, Kraft WK, Greenberg H, Waldman SA (2004) *Potential for interactions between caspofungin and nelfinavir or rifampin*. Antimicrob Agents Chemother. 48(11):4306–4314
156. Kami M, Sawada Y, Mori S, Hirate J, Kojima N, Kanda Y, Moriya A, Yuji K, Saito T, Chiba S, Hirai H (2001) *Serum levels of fluconazole in patients after cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy*. Am J Hematol. 66(2):85–91
157. Hariprasad SM, Mieler WF, Holz ER, Gao H, Kim JE, Chi J, Prince RA (2004) *Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans*. Arch Ophthalmol. 122(1):42–47
158. Driscoll TA, Frangoul H, Nemecek ER, Murphey DK, Yu LC, Blumer J, Krance RA, Baruch A, Liu P (2011) *Comparison of pharmacokinetics and safety of voriconazole intravenous-to-oral switch in immunocompromised adolescents and healthy adults*. Antimicrob Agents Chemother. 55(12):5780–5789
159. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. Nature 282(5739):615–616
160. Flynn TJ, Ferguson MS (2008) *Multitendpoint mechanistic profiling of hepatotoxicants in HepG2/C3A human hepatoma cells and novel statistical approaches for development of a prediction model for acute hepatotoxicity*. Toxicol in Vitro. 22(6):1618–1631
161. Baudoin R, Griscom L, Prot JM, Legallais C, Leclerc E (2011) *Behaviour of HepG2/C3A cell culture in a microfluidic bioreactor*. Biochem Eng J 53(2):172–181
162. Ballet F, Bouma ME, Wang SR, Amit N, Marais J, Infante R (1984) *Isolation, culture and characterization of adult human hepatocytes from surgical liver biopsies*. Hepatology 4(5):849–854
163. Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Castell JV (1993) *A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates*. Anal Biochem. 213(1):29–33
164. Belinsky SA, Popp JA, Kauffman FC, Thurman RG (1984) *Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver lobule: studies with allyl alcohol in the perfused liver*. J Pharmacol Exp Ther. 230(3):755–760
165. Sarkar S, Kalia V, Montelaro RC (2003) *Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing*. Cryobiology 47(1):44–58
166. Schmitz S (2009) *Der Experimentator: Zellkultur*, 2. Aufl. Der @Experimentator. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
167. Modrianský M, Ulrichová J, Bachleda P, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Walterová D, Simánek V (2000) *Human hepatocyte—a model for toxicological studies. Functional and biochemical characterization*. Gen Physiol Biophys. 19(2):223–235

-
168. Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Goldberg E, Vander Jagt, D L (2001) *Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4*. Biochem Pharmacol. 62(1):81–89
169. Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (1972) Z Klein Chem Klin Biochem:182
170. Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA (2004) *Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 40(5-6):172–182
171. Hayes AW (2007) *Principles and Methods of Toxicology*, Fifth Edition, 5th ed. Taylor and Francis, Hoboken
172. Molecular Probes *LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit* *mammalian cells* 2005
173. Haugland R (1996) *Assay for cells viability, proliferation and function*. In Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc (6):365–398
174. Goodhew PJ, Beanland R, Humphreys FJ (2001) *Electron microscopy and analysis*, 3rd ed. Taylor & Francis, London
175. Williams DB, Carter CB (2009) *Transmission electron microscopy*. A textbook for materials science, 2nd ed. Springer, New York
176. Reimer L, Kohl H (2008) *Transmission electron microscopy*. Physics of image formation, 5th ed. Springer series in optical sciences, vol. 36. Springer, New York
177. Reimer L Scanning electron microscopy (1992) *Physics of image formation and microanalysis, Second completely revised and updated edition*. Springer series in optical sciences, volume 45
178. Egerton RF (©2005) *Physical principles of electron microscopy*. An introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer Science+Business Media, New York
179. Schmidt PF (1994) *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. Kontakt & Studium, vol. 444. Expert Verlag, Renningen-Malmsheim
180. Ullrich H, Reed SJ. (1994) *Electron microprobe analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, zweite Auflage 1993, 326 Seiten mit 170 Illustrationen, 3 Farbtafeln, ISBN 0-521-41956-5. Cryst. Res. Technol. 29(3):392
181. Lescoat G, Desvergne B, Loreal O, Padeloup N, Deugnier Y, Bourel M, Brissot P (1989) *Modulation of albumin secretion by ornithine alpha-ketoglutarate in adult rat hepatocyte cultures and a human hepatoma cell line (HepG2)*. Ann Nutr Metab. 33(5):252–260
182. Hellsing K (1973) *The effects of different polymers for enhancement of the antigenantibody reaction as measured with nephelometry*. In: Peeters H (ed.): Protides of the Biological Fluids. Oxford Pergamon Press
183. Soucek P, Gut I (1992) *Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms*. Xenobiotica 22(1):83–103
184. Parke DV (1984) *Principles, mechanism and biological consequences of induction in Frontiers in Biotransformation*, 2nd edn. Akademie-Verlag Berlin
185. Ioannides C (©1996) *Cytochromes P450*. Metabolic and toxicological aspects. CRC Press, Boca Raton
186. Kelly JH, Sussman NL (2000) *A fluorescent cell-based assay for cytochrome P-450 isozyme 1A2 induction and inhibition*. J Biomol Screen 5(4):249–254

-
187. Donato MT, Castell J, Gómez-Lechón MJ (1993) *A rapid and sensitive method for measuring monooxygenase activities in haptocytes cultured in 96-well plates*. Tiss Cul Ass (14):153–158
188. Huang MT, Miwa GT, Cronheim N, Lu AY (1979) *Rat liver cytosolic azoreductase. Electron transport properties and the mechanism of dicumarol inhibition of the purified enzyme*. J Biol Chem. 254(22):11223–11227
189. Schwirzer S (1998) *Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Bestimmung von 2,3,7,8-TCDD-Äquivalenzwerten in umweltrelevanten Matrices unter Einbeziehung chemischer Cleanup-Schritte*. Chemie. Utz, Wiss, München
190. Almeida L de, Froneman W, Pletschke B (2011) *Optimization of a Cytochrome-P450-Monooxygenase-1A-Mediated EROD Assay in the Cape Hake Species Merluccius capensis and Merluccius paradoxus (Pisces)*. Enzyme Res.
191. WAKABAYASHI M, FISHMAN WH (1961) *The comparative ability of beta-glucuronidase preparations (liver, Escherichia coli, Helix pomatia, and Patella vulgata) to hydrolyze certain steroid glucosiduronic acids*. J Biol Chem. 236:996–1001
192. Guengerich FP (2003) *Cytochromes P450, drugs, and diseases*. Mol Interv. 3(4):194–204
193. Wrighton SA, Stevens JC (1992) *The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism*. Crit Rev. Toxicol. 22(1):1–21
194. Renwick AB, Ball SE, Tredger JM, Price RJ, Walters DG, Kao J, Scatina JA, Lake BG (2002) *Inhibition of zaleplon metabolism by cimetidine in the human liver: in vitro studies with subcellular fractions and precision-cut liver slices*. Xenobiotica 32(10):849–862
195. Stresser DM, Turner SD, Blanchard AP, Miller VP, Crespi CL (2002) *Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4*. Drug Metab. Dispos. 30(7):845–852
196. Miller VP, Stresser DM, Blanchard AP, Turner S, Crespi CL (2000) *Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450*. Ann N Y Acad Sci. 919:26–32
197. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991) *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT*. J Immunol Methods 142(2):257–265
198. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res. 48(17):4827–4833
199. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ (1995) *A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function*. Growth Regul. 5(2):69–84
200. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL (1992) *Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells*. J Immunol Methods. 147(2):153–165
201. Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev. 11:127–152
202. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, Maronpot RR, Trump BF (1999) *The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists*. Toxicol Pathol. 27(4):484–490
203. Ganten D, Ruckpaul K, Aretz S (2008) *Grundlagen der Molekularen Medizin, 3., überarbeitete und erw. Aufl.* Springer Medizin, Heidelberg

-
204. Aigner T (2002) *Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens?* J Pathol. 198(1):1–4
205. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) *The machinery of programmed cell death.* Pharmacol Ther. 92(1):57–70
206. Hengartner MO (2000) *The biochemistry of apoptosis.* Nature 407(6805):770–776
207. Elmore S (2007) *Apoptosis: a review of programmed cell death.* Toxicol Pathol. 35(4):495–516
208. Shapiro HM (2003) *Practical flow cytometry*, 4th ed. Wiley-Liss, New York
209. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D (2002) *Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis.* Hepatology 36(3):602–614
210. Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P (1996) *Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death.* J Exp. Med. 184(5):2067–2072
211. Sodeman T, Bronk S, Roberst P (2002) *Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas.* Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol. 992–999
212. Langsch A, Giri S, Acikgöz A, Jasmund I, Frericks B, Bader A (2009) *Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture.* Toxicology Lett. 188(3):173–179
213. Ringel M, von Mach M A, Santos R, Feilen PJ, Brulport M, Hermes M, Bauer AW, Schormann W, Tanner B, Schön MR, Oesch F, Hengstler JG (2005) *Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction.* Toxicology 206(1):153–167
214. Sauer M (2007) *Verwendung von humanen Hepatozyten und in-vitro-Verfahren zur Ermittlung der Leberfunktion und Leberregeneration*, (WO 2007/090633)
215. Sauer M, Haubner C, Mencke T, Nöldge-Schomburg G, Mitzner S, Altrichter J, Stange J (2012) *Impaired cell functions of hepatocytes incubated with plasma of septic patients.* Inflamm Res. 61(6):609–616
216. Haubner C (2010) *Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der Leberfunktion auf der Basis humanen Hepatozyten (Biosensor) bei septischen Patienten: Ergebnisse einer Pilotstudie.* Dissertation, Universität Rostock
217. Piel I (2014) *In-vitro Testung des hepatotoxischen Potentials von Muskelrelaxantien.* Dissertation, Universität Rostock
218. Stiffel M (2014) *Biologische Wirkung von Caprylat - Auswirkung in humanen Albuminlösungen für therapeutische Anwendungen.* Dissertation, Universität Rostock
219. Behme S, Brämert M, Prowe SG (2010) *Biotechnologie*, 1. Aufl. GMP-Berater-Paperback, Bd. 8. Maas & Peither, GMP-Berater, Schopfheim
220. Madea B (©2015) *Rechtsmedizin*. Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung, 3., Auflage. Springer, Berlin
221. Dr. Georg Kojda *Paracetamol - Hinweise für die Beratung und Abgabe*
222. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006) *Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?* Hepatology 43(2 Suppl 1):S31–44

-
223. Riemann JF, Adam B (2008) *Gastroenterologie*. Das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Stuttgart [u.a.], Thieme
224. Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
225. Runge D, Köhler C, Kostrubsky VE, Jäger D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE, Michalopoulos GK (2000) *Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun. 273(1):333–341
226. Schneider C (2007) *Proliferation und Funktion serumfreier kultivierter Hepatozyten*. Dissertation, Martin-Luther-Universität
227. Gstraunthaler G, Lindl T (2013) *Zell- und Gewebekultur*. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, 7. Auflage. Springer Link : Bücher. Springer Spektrum, Berlin
228. Mosmann T (1983) *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods. 65(1-2):55–63
229. Paepe P de, Belpaire FM, Buylaert WA (2002) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations when treating patients with sepsis and septic shock*. Clin Pharmacol Kinet. 41(14):1135–1151
230. Frey O, Probst W (eds) (1997) *Pharmakokinetik in der täglichen Praxis*. Einführung mit Übung PZ Prisma, 6 (1), Heidenheim
231. Popick AC, Crouthamel WG, Bekersky I (1987) *Plasma protein binding of ceftriaxone*. Xenobiotica 17(10):1139–1145
232. Rodriguez RJ, Acosta D (1997) *N-deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes*. Toxicology 117(2-3):123–131
233. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW (1990) *Amphotericin B: 30 years of clinical experience*. Rev Infect Dis. 12(2):308–329
234. (1992) American Hospital Formulary Service drug information 92. American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda
235. Plumb DC (1999) *Veterinary drug handbook*, 3rd ed. Distributed by Iowa State University Press, Ames
236. Adams HR (1995) *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames
237. Pyle RL (1981) *Clinical pharmacology of amphotericin B*. J Am Vet Med Assoc. 179(1):83–84
238. Maesaki S (2002) *Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents*. Curr Pharm Des. 8(6):433–440
239. Slain D (1999) *Lipid-based amphotericin B for the treatment of fungal infections*. Pharmacotherapy 19(3):306–323
240. Mehta J (1997) *Do variations in molecular structure affect the clinical efficacy and safety of lipid-based amphotericin B preparations?* Leuk Res. 21(3):183–188
241. Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, Fielding RM, Buell D, Walsh TJ (1999) *Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs*. Pharm Res. 16(11):1694–1701

-
242. Juliano RL, Grant CW, Barber KR, Kalp MA (1987) *Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes*. Mol Pharmacol. 31(1):1–11
243. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ (1998) *Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities*. Clin Infect Dis. 27(3):603–618
244. Buttle I (2004) *O/W-Emulsion für die intravenöse Applikation von Arzneistoffen*. Dissertation, Freie Universität Berlin
245. Wasan KM, Lopez-Berestein G (1997) *Diversity of lipid-based polyene formulations and their behavior in biological systems*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 16(1):81–92
246. Ruppanner H, Morant J (1999) *Arzneimittel-Kompendium der Schweiz*. Patienteninformationen, 21. Aufl. Arzneimittel-Kompendium der Schweiz. Documed, Basel
247. Veerareddy PR, Vobalaboina V (2004) *Lipid-based formulations of amphotericin B*. Drugs Today 40(2):133–145
248. Hann IM, Prentice HG (2001) *Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use*. Int J Antimicrob Agents 17(3):161–169
249. Johansen HK, Gotzsche PC (2000) *Amphotericin B lipid soluble formulations vs amphotericin B in cancer patients with neutropenia*. Cochrane Database Syst Rev.
250. Hitchcock CA (1991) *Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of Candida albicans and its interaction with azole antifungals*. Biochem Soc Trans. 19(3):782–787
251. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC (1994) *Molecular mechanisms of drug resistance in fungi*. Trends Microbiol. 2(10):393–400
252. Ghannoum MA, Rice LB (1999) *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. Clin Microbiol Rev. 12(4):501–517
253. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM (1999) *Current and emerging azole antifungal agents*. Clin Microbiol Rev. 12(1):40–79
254. Tonner PH, Hein L (2011) *Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin*. Springer, Berlin
255. Kerwin SC, McCarthy RJ, VanSteenhouse JL, Partington BP, Taboada J (1998) *Cervical spinal cord compression caused by cryptococcosis in a dog: successful treatment with surgery and fluconazole*. J Am Anim Hosp Assoc. 34(6):523–526
256. Muñoz P, Moreno S, Berenguer J, Bernaldo de Quirós, J C, Bouza E (1991) *Fluconazole-related hepatotoxicity in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. Arch Intern Med. 151(5):1020–1021
257. Trujillo MA, Galgiani JN, Sampliner RE (1994) *Evaluation of hepatic injury arising during fluconazole therapy*. Archives Intern. Med. 154(1):102–104
258. Franklin IM, Elias E, Hirsch C (1990) *Fluconazole-induced jaundice*. Lancet 336(8714):565
259. Guillaume MP, Prez C de, Cogan E (1996) *Subacute mitochondrial liver disease in a patient with AIDS: possible relationship to prolonged fluconazole administration*. AM J Gastroenterol 91(1):165–168
260. Bronstein JA, Gros P, Hernandez E, Larroque P, Molinié C (1997) *Fatal acute hepatic necrosis due to dose-dependent fluconazole hepatotoxicity*. Clin Infect Dis. 25(5):1266–1267
261. Buchi KN, Gray PD, Tolman KG (1986) *Ketoconazole hepatotoxicity: an in vitro model*. Biochem Pharmacol. 35(16):2845–2847

262. Medizinische Universität Innsbruck (2009) *Pharmainformation 7/1 - Fluconazol*. www.2.i-med.ac.at/pharmakologie/info/info7-1.html#triazol
263. Rodriguez RJ, Acosta D (1997) *Metabolism of ketoconazole and deacetylated ketoconazole by rat hepatic microsomes and flavin-containing monooxygenases*. Drug Metab. Dispos. 25(6):772–777
264. Somchit N, Hassim SM, Samsudin SH (2002) *Itraconazole- and fluconazole-induced toxicity in rat hepatocytes: a comparative in vitro study*. Hum Exp. Toxicol. 21(1):43–48
265. Crerar-Gilbert A, Boots R, Fraenkel D, MacDonald GA (1999) *Survival following fulminant hepatic failure from fluconazole induced hepatitis*. Anaesth Intensive Care. 27(6):650–652
266. Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H (2007) *Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes*. Biochem Pharmacol. 73(12):2020–2026
267. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H (2006) *Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole*. Clin Pharmacol. 45(7):649–663
268. Howard A, Hoffman J, Sheth A (2008) *Clinical application of voriconazole concentrations in the treatment of invasive aspergillosis*. Ann Pharmacother. 42(12):1859–1864
269. Dolton MJ, Ray JE, Chen SC, Ng K, Pont LG, McLachlan AJ (2012) *Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring*. Antimicrob Agents Chemother. 56(9):4793–4799
270. Pascual A, Csajka C, Buclin T, Bolay S, Bille J, Calandra T, Marchetti O (2012) *Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections*. Clin Infect. Dis. 55(3):381–390
271. Hyland R, Jones BC, Smith DA (2003) *Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole*. Drug Metab. Dispos. 31(5):540–547
272. Purkins L, Wood N, Greenhalgh K, Allen MJ, Oliver SD (2003) *Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety*. Br J Clin Pharmacol. 66(1):10–16
273. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther. 270(1):414–423
274. Zonios D, Yamazaki H, Murayama N, Natarajan V, Palmore T, Childs R, Skinner J, Bennett JE (2014) *Voriconazole metabolism, toxicity, and the effect of cytochrome P450 2C19 genotype*. J Infect Dis. 209(12):1941–1948
275. Levêque D, Nivoix Y, Jehl F, Herbrecht R (2006) *Clinical pharmacokinetics of voriconazole*. Int J Antimicrob Agents 27(4):274–284
276. Sirohi B, Powles RL, Chopra R, Russell N, Byrne JL, Prentice HG, Potter M, Koblinger S (2006) *A study to determine the safety profile and maximum tolerated dose of micafungin (FK463) in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation*. Bone marrow Transplant. 38(1):47–51
277. Barth, R *Infektiologie & Hygiene, Der neue Standard bei invasiven Candida-Infektionen*. www.infektiologie-hygiene.universimed.com/artikell/der-neue-standard-bei-invasiven-candida-infektionen. (7.01.2011)

278. Wagner C, Graninger W, Presterl E, Joukhadar C (2006) *The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications*. Pharmacology 78(4):161–177
279. Villanueva A, Gotuzzo E, Arathoon EG, Noriega LM, Kartsonis NA, Lupinacci RJ, Smietana JM, DiNubile MJ, Sable CA (2002) *A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis*. Am J Med. 113(4):294–299
280. Arathoon EG, Gotuzzo E, Noriega LM, Berman RS, DiNubile MJ, Sable CA (2002) *Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother. 46(2):451–457
281. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J (2002) *Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis*. N Engl J Med. 347(25):2020–2029
282. Sable CA, Nguyen BT, Chodakewitz JA, DiNubile MJ (2002) *Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections*. Transpl Infect Dis. 4(1):25–30
283. Glöckner A (2011) *Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature*. Eur J Med Res. 16(4):167–179
284. Kofla G, Ruhnke M (2011) *Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature*. Eur J Med Res. 16(4):159–166
285. Europäischen-Arzneimittel-Agentur (EMA) ANHANG I - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels - Ecalta. http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2007/2007092029770/anx_29770_de.pdf
286. Pfizer (2014) *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels - Ecalta*. www.pfizer.de/fileadmin/pfizer.de/documents/fi/010608_freigabe.pdf
287. Wehling M (ed) (2011) *Klinische Pharmakologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
288. Universimed KV (2009) *Anidulafungin: rasche fungizide Wirkung und gute Response*. anaesthesiologie-intensivmedizin.universimed.com/artikel/anidulafungin-rasche-fungizide-wirkung-und-gute-response. Accessed 24 March 2010
289. Denning DW (2003) *Echinocandin antifungal drugs*. Lancet 362(9390):1142–1151
290. Kauffman CA, Carver PL (2008) *Update on echinocandin antifungals*. Semin Respir Crit Med. 29(2):211–219
291. Mühlenfeld (1999) *Untersuchung zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie HepG2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistar ratte*. Dissertation, Humboldt-Universität
292. Doostdar H, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1991) *The effects of dimethylsulphoxide and 5-aminolaevulinic acid on the activities of cytochrome P450-dependent mixed function oxidase and UDP-glucuronosyl transferase activities in human Hep G2 hepatoma cells*. Biochem Pharmacol. 42(6):1307–1313
293. Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G (1989) *Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins*. In Vitro Cell Dev Biol. 25(3 Pt 1):267–275

294. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) *Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells*. Drug Metab. Dispos. 34(1):75–83
295. Rueff J, Chiapella C, Chipman JK, Darroudi F, Silva ID, Duverger-van Bogaert M, Fonti E, Glatt HR, Isern P, Laires A, Léonard A, Llagostera M, Mossesso P, Natarajan AT, Palitti F, Rodrigues AS, Schinoppi A, Turchi G, Werle-Schneider G (1996) *Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays*. Muta Res. 353(1-2):151–176
296. Fardel O, Morel F, Ratanasavanh D (1992) *Expression of drug metabolizing enzymes in human HepG2 hepatoma cells*. Cell Mol As Cirr. (216):327–330
297. Duthie SJ, Coleman C (1988) *Status of reduced glutathione in the human hepatoma cell line HepG2*. Biochem Pharmacol. (37):3365–3368
298. Grant MH, Duthie SJ, Gray AG, Burke MD (1988) *Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line*. Biochem Pharmacol. 37(21):4111–4116
299. Labruzzo P, Yu XF, Dufresne MJ (1989) *Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and demonstration of a specific nuclear receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in two human hepatoma cell lines*. Biochem Pharmacol. 38(14):2339–2348
300. Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Böttger T, Oesch F (2000) *Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction*. Drug Metab Rev. 32(1):81–118
301. Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH (1994) *The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience*. Artif Organs. 18(5):390–396
302. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R (1996) *Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure*. Hepatology. 24(6):1446–1451
303. Vital Therapies (2013) Vital Therapies, Inc. rekrutiert ersten Patienten in VTI-208, einer kontrollierten Phase-III-Studie zur Bewertung des ELAD-Systems bei alkoholinduzierter Leberdekompensation. www.marketwired.com/press-release/vital-therapies-inc-rekrutiert-ersten-patienten-vti-208-einer-kontrollierten-phase-iii-1775515.htm
304. Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ (2004) *Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential*. Chem Biol Interact. 150(1):115–128
305. Sistare FD, DeGeorge JJ (2007) *Preclinical predictors of clinical safety: opportunities for improvement*. Clin Pharmacol Ther. 82(2):210–214
306. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, Gao B, Kaludercic N, Angeline A, Bernardi P, Brain P, Hougham C (2006) *High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening*. Arch Toxicol. 80(9):580–604
307. O'Brien P, Haskins JR (2007) *In vitro cytotoxicity assessment*. Methods Mol Biol. 356:415–425
308. Lindl T, Lewandowski B, Schreyögg S, Stäudte A (2005) *An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the*

- neutral red uptake and MTT assays. Alternatives to laboratory animals* : ATLA 33(6):591–601
309. Altman SA, Randers L, Rao G (1993) *Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations*. Biotechnol Prog. 9(6):671–674
 310. Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ (1976) *Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds*. Exp Cell Res. 97(2):275–280
 311. Weislow OS, Kiser R, Fine DL, Bader J, Shoemaker RH, Boyd MR (1989) *New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity*. J Natl Cancer Inst. 81(8):577–586
 312. Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD (1995) *A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT)*. J Infect Dis. 172(4):1153–1156
 313. Nargi FE, Yang TJ (1993) *Optimization of the L-M cell bioassay for quantitating tumor necrosis factor alpha in serum and plasma*. J Immunol Methods. 159(1-2):81–91
 314. Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG (1991) *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. Cancer Commun. 3(7):207–212
 315. Uludag H, Sefton MV (1990) *Colorimetric assay for cellular activity in microcapsules*. Biomaterials. 11(9):708–712
 316. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A (1993) *In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay*. Biomaterials 14(5):359–364
 317. Denizot F, Lang R (1986) *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol. Methods. 89(2):271–277
 318. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res. 47(4):936–942
 319. Jelinek A (2001) *In-vitro-Toxizität grenzflächen-aktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran mitochondrialer Funktionen und Apoptose*. Dissertation, Martin-Luther-Universität
 320. Barile FA (1994) *Introduction to in vitro cytotoxicology. Mechanisms and methods*. CRC Press, Boca Raton
 321. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D (1992) *Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium*. J Biotechnol. 25(3):231–243
 322. Drobner C, Glöckner R, Müller D (2000) *Optimal oxygen tension conditions for viability and functioning of precision-cut liver slices*. Exp Toxicol Pathol. 52(4):335–338
 323. Bergmeyer HU (1985) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Verl. Chemie, Weinheim u.a.
 324. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM (1997) *The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review*. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 35(8):569–579
 325. Guicciardi ME, Gores GJ (2005) *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. Gut 54(7):1024–1033

326. Thomas L (ed) (2005) *Labor und Diagnose*. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 6. Aufl. TH-Books-Verl.-Ges, Frankfurt/Main
327. Nussler AK, Wang A, Neuhaus P, Fischer J, Yuan J, Liu L, Zeilinger K, Gerlach J, Arnold PJ, Albrecht W (2001) *The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism*. ALTEX 18(2):91–101
328. Burke MD, Mayer RT (1974) *Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene*. Drug Metab. Dispos. 2(6):583–588
329. Buhler DR, Wang-Buhler JL (1998) *Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 121(1-3):107–137
330. Schmitz HJ, Hagenmaier A, Hagenmaier HP, Bock KW, Schrenk D (1995) *Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells*. Toxicology 99(1-2):47–54
331. Hylland K, Sandvik M Biomarkers in Flounders (*Platichthys flesus*): *An evaluation of their use in pollution monitoring*. Mar Euv Res 1996(42 (1-4)):223–227
332. Daly AK (2003) *Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes*. Fundam Clin Pharmacol. 17(1):27–41
333. Cresteil T (1998) *Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications*. Food Addit Contam. 15 Suppl:45–51
334. Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988) *The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line*. FEBS Lett. 241(1-2):15–18
335. Pfeifer S (©1984) *Grundlagen der Biopharmazie*. Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation. Verlag Chemie, Weinheim
336. Doostdar H, Demoz A, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1990) *Variation in drug-metabolizing enzyme activities during the growth of human Hep G2 hepatoma cells*. Xenobiotica 20(4):435–441
337. Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Jover R, Nakamura T, Castell JV (1998) *Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture*. J Pharmacol Exp Ther. 284(2):760–767
338. Nyberg SL, Rimmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu WS, Cerra FB (1994) *Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver*. Ann Surg. 220(1):59–67
339. Gibson GG, Skett P (©1999) *Introduction to drug metabolism*, 2nd ed. Stanley Thornes, Cheltenham
340. Rogiers V, Vandenberghe Y, Callaerts A, Sonck W, Vercruysse A (1990) *Effects of dimethylsulphoxide on phase I and II biotransformation in cultured rat hepatocytes*. Toxicol In Vitro. (4-5):439–442
341. Schepers G, Aschmann C, Mörchel S (1990) *The use of primary cultured rat hepatocytes for the assessment of xenobiotic effect on biotransformation*. Scand Cell Toxicol Con 7 1990:209–213
342. Yan Z, Caldwell GW (2001) *Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery*. Curr Top Med Chem. 1(5):403–425

343. Leite SB, Wilk-Zasadna I, Zaldivar JM, Airola E, Reis-Fernandes MA, Mennecozzi M, Guguen-Guillouzo C, Chesne C, Guillou C, Alves PM, Coecke S (2012) *Three-dimensional HepaRG model as an attractive tool for toxicity testing*. Toxicol Sci. 130(1):106–116
344. Korber DR, Choi A, Wolfaardt GM, Caldwell DE (1996) *Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability*. Applied Environ Microbiol 62(11):3939–3947
345. Weibel ER, Elias H (1967) *Quantitative Methods in Morphology / Quantitative Methoden in der Morphologie*. Springer Berlin Heidelberg
346. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 26(4):239–257
347. Thompson CB (1995) *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science 267(5203):1456–1462
348. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S (1993) *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature 364(6440):806–809
349. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D (2002) *Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner*. Gastroenterology 122(5):1411–1427
350. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ (2000) *Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas*. Am J Physiol Liver Physiol. 278(6):G992-9
351. Labroille G, Dumain P, Lacombe F, Belloc F (2000) *Flow cytometric evaluation of fas expression in relation to response and resistance to anthracyclines in leukemic cells*. Cytometry 39(3):195–202
352. Clément MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S (1998) *Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells*. Blood 92(3):996–1002
353. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997) *Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53*. J Clin Invest. 99(3):403–413
354. Becker S, Reinehr R, Grether-Beck S, Eberle A, Häussinger D (2007) *Hydrophobic bile salts trigger ceramide formation through endosomal acidification*. Biol Chem. 388(2):185–196
355. Piechotta G (1999) *Überprüfung der Eignung von Apoptose als Biomarker im biologischen Effektmontoring*. Dissertation, Universität Hamburg
356. Reed JC (2000) *Apoptosis*. Methods in enzymology, v. 322. Academic Press, San Diego
357. Reyher U von, Sträter J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Möller P (1998) *Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis*. Cancer research 58(3):526–534
358. Kon K, Ikejima K, Okumura K, Aoyama T, Arai K, Takei Y, Lemasters JJ, Sato N (2007) *Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity*. J Gastroenterol Hepatol. 22 Suppl 1:S49-52
359. Wiger R, Finstad HS, Hongso JK, Haug K, Holme JA (1997) *Paracetamol inhibits cell cycling and induces apoptosis in HL-60 cells*. Pharmacol Toxicol. 81(6):285–293

360. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M (2004) *Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharma-col. 369(1):23–37
361. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I (1997) *Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences*. Am J Hum Gent. 60(2):284–295
362. Berufsverband Deutscher Internisten e.V. (2008) *Medikamente können unbehandelte Zusatzstoffe enthalten*. www.internisten-im-netz.de/de_news_6_0_231_medikamente-k-nnen-unbekannte-zusatzstoffe-enthalten.html
363. Farkas D, Tannenbaum SR (2005) *In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review*. Curr Drug Metab. 6(2):111–125
364. Ponsoda X, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Fabra R, Carrasco E, Trullenque R, Castell JV (2001) *Drug biotransformation by human hepatocytes*. J Hepatol. 34(1):19–25
365. McMillan JM, Shaddock JG, Casciano DA, Arlotto MP, Leakey JE (1991) *Differential stability of drug-metabolizing enzyme activities in primary rat hepatocytes, cultured in the absence or presence of dexamethasone*. Muta Res. 249(1):81–92
366. Niemann C, Gauthier JC, Richert L, Ivanov MA, Melcion C, Cordier A (1991) *Rat adult hepatocytes in primary pure and mixed monolayer culture. Comparison of the maintenance of mixed function oxidase and conjugation pathways of drug metabolism*. Biochem Pharmacol. 42(2):373–379
367. Shimada T, Mimura M, Inoue K, Nakamura S, Oda H, Ohmori S, Yamazaki H (1997) *Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans*. Arch Toxicol. 71(6):401–408
368. Javitt NB (1990) *Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids*. FASEB J 4(2):161–168
369. Casadevall A, Relman DA (2010) Microbial threat lists: obstacles in the quest for biosecurity? Nat Rev. Microbiol. 8(2):149–154
370. Nucci M, Marr KA (2005) Emerging fungal diseases. Clin Infect Dis. 41(4):521–526
371. Österreichische Ärztezeitung (2013) Pilzphrophylaxe
372. Nguyen TH, Hoppe-Tichy T, Geiss HK, Rastall AC, Swoboda S, Schmidt J, Weigand MA (2007) *Factors influencing caspofungin plasma concentrations in patients of a surgical intensive care unit*. J Antimicrob Chemother 60(1):100–106
373. Tuschl G (2011) *Serumfreie Collagen Monolayer- und Sandwich-Kulturen primärer Hepatozyten als ein wertvolles zur Detektion von Toxizität und Arzneimittelwechselwirkung in vitro*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität
374. Chen Y, Johansson E, Yang Y, Miller ML, Shen D, Orlicky DJ, Shertzer HG, Vasiliou V, Nebert DW, Dalton TP (2010) *Oral N-acetylcysteine rescues lethality of hepatocyte-specific Gclc-knockout mice, providing a model for hepatic cirrhosis*. J Hepatol. 53(6):1085–1094
375. Ärzteblatt (2006) *Astra Zeneca nimmt Exanta vom Markt - Hepatotoxizität von Ximelagatran seit Jahren bekannt*.
376. Pharmazeutische Zeitung (20011) *Rückrufe im Rückblick. Arzneimittelrücknahmen*. Pharmazeutische Zeitung

377. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, van Deun K, Berger B, Heller A (2000) *Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals*. Regul Toxicol Pharmacol. 32(1):56–67
378. Lee WM, Senior JR (2005) Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions. Toxicol Pathol. 33(1):155–164